



F-8070

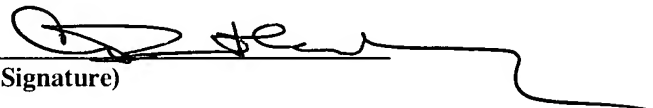
**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

Applicant : Thomas HAEUPL, et al.  
Serial No. : 10/727,167  
Filed : December 1, 2003  
For : TOOLS FOR THE DIAGNOSIS, MOLECULAR  
DEFINITION AND DEVELOPMENT OF  
TREATMENT OF CHRONIC INFLAMMATORY  
JOINT DISEASES

**Certificate of Mailing Under 37 CFR 1.8**

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to COMMISSIONER FOR PATENTS, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 on April 1, 2004.

C. Bruce Hamburg  
(Name)

  
(Signature)

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

**LETTER FORWARDING CERTIFIED PRIORITY DOCUMENT**

Sir:

The above-identified application was filed claiming a right of priority based on applicant's corresponding foreign applications as follows:

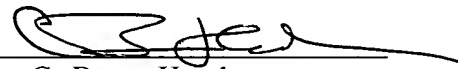
<u>Country</u>	<u>No.</u>	<u>Filing Date</u>
Germany	101 27 572.2	May 30, 2001
Germany	PCT/DE02/02010	May 30, 2002

A certified copy of said documents are annexed hereto and it is respectfully requested that these documents be filed in respect to the claim of priority. The priority of the above-identified patent application is claimed under 35 U.S.C. § 119.

Respectfully submitted,

Jordan and Hamburg LLP

By

  
C. Bruce Hamburg  
Reg. No. 22,389  
Attorney for Applicants

Jordan and Hamburg LLP  
122 East 42nd Street  
New York, New York 10168  
(212) 986-2340

CBH/mg  
Enclosure: Certified Priority Documents

Jordan und Hamburg WP  
F-8070  
10/727, 167



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer internationalen Patentanmeldung

**Aktenzeichen:**

PCT/DE 02/02010

**Internationaler  
Anmeldetag:**

30. Mai 2002

**Anmelder/Inhaber:**

OLIGENE GmbH, 10117 Berlin/DE;  
Thomas Häupl, 15537 Erkner/DE;  
Ute Ungethüm, 10115 Berlin/DE;  
Stefan Bläß, 12107 Berlin/DE.

**Bezeichnung:**

Werkzeuge zur Diagnostik, molekularen Definition  
und Therapieentwicklung chronischer entzündlicher  
Gelenkerkrankungen

**IPC:**

noch nicht festgelegt

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser internationalen Patentanmeldung.**

München, den 13. Februar 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Remis

# PCT

## ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

**PCT/DE 02 / 02010**

Internationales Aktenzeichen

30. Mai 2002

Internationales Anmeldedatum

30.05.02

**RO/DE** Deutsches Patent- und Markenamt  
Name des Anmeldeamts und PCT International Trade Mark Office  
Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)  
(max. 12 Zeichen) **0250**

**Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG**  
Werkzeuge zur Diagnostik, molekularen Definition und Therapieentwicklung chronischer entzündlicher Gelenkerkrankungen

**Feld Nr. II ANMELDER** ☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

PathoArray GmbH  
c/o Pine Private Equity  
Jägerstr. 51  
D-10117 Berlin, DE

Original 6784

2.10.306 u. 15.07.03

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Registrierungsnr. des Anmelders beim Amt:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmel-  
der für folgende Staaten:

☐ alle Bestim-  
mungsstaaten

☒ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten  
Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld  
angegebenen Staaten

**Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER**

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

HÄUPL, Thomas  
Am Schützenwäldchen 59  
D-15537 Erkner  
DE

Diese Person ist:

☐ nur Anmel-  
der.

☒ Anmel-  
der und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen  
angekreuzt, so sind die nachstehenden  
Angaben nicht nötig.)

Registrierungsnr. des Anmelders beim Amt:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmel-  
der für folgende Staaten:

☐ alle Bestim-  
mungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten  
Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld  
angegebenen Staaten

☒ Weitere Anmel-  
der und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

**Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT**

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmel-  
der vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als:

☒ Anwalt

☐ gemeinsamer  
Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

WEHLAN, Helmut  
Paul-Gesche-Straße 1  
D-10315 Berlin  
DE

Telefonnr.:

030-52279977

Telefaxnr.:

030-52279976

Fernschreibnr.:

Registrierungsnr. des Anwalts beim Amt:

☐ Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.



**Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER***Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.*

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

UNGETHÜM, Ute

Chausseestr. 93

D-10115 Berlin

DE

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder☒ Anmelder und Erfinder☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Registrierungsnr. des Anmelders beim Amt:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

BLÄSS, Stefan (Bläß, Stefan)

Furkastr. 74

D-12107 Berlin

DE

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder☒ Anmelder und Erfinder☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Registrierungsnr. des Anmelders beim Amt:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder☐ Anmelder und Erfinder☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Registrierungsnr. des Anmelders beim Amt:

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder☐ Anmelder und Erfinder☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Registrierungsnr. des Anmelders beim Amt:

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN Bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen:

## Regionales Patent

- ☒ AP ARIPO-Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mosambik, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swasiland, TZ Vereinigte Republik Tansania, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☒ EA Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidshan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH & LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden, TR Türkei und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist. (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

- |   |  |   |
|---|--|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE Vereinigte Arabische Emirate   | <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana   | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko                         |
| <input checked="" type="checkbox"/> AG Antigua und Barbuda            | <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia  | <input checked="" type="checkbox"/> MZ Mosambik                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albanien                       | <input checked="" type="checkbox"/> HR Kroatien  | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenien                       | <input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn  | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Neuseeland                     |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Österreich                     | <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesien                                      | <input checked="" type="checkbox"/> PL Polen                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien                     | <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel  | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Aserbaidshan                   | <input checked="" type="checkbox"/> IN Indien  | <input checked="" type="checkbox"/> RO Rumänien                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina            | <input checked="" type="checkbox"/> IS Island  | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation           |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados                       | <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan   |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarien                      | <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenia   | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien                      | <input checked="" type="checkbox"/> KG Kirgisistan                                     | <input checked="" type="checkbox"/> SE Schweden                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus                        | <input checked="" type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea               | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapur                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> BZ Belize                         | <input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea                                  | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slowenien                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada                         | <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kasachstan                                      | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH & LI Schweiz und Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia                                     | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China                          | <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka                                       | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadschikistan                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> CO Kolumbien                      | <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia   | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica                     | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho   | <input checked="" type="checkbox"/> TR Türkei                         |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Kuba                           | <input checked="" type="checkbox"/> LT Litauen   | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago            |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik          | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxemburg                                       |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Deutschland                    | <input checked="" type="checkbox"/> LV Lettland  | <input checked="" type="checkbox"/> TZ Vereinigte Republik Tansania   |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Dänemark                       | <input checked="" type="checkbox"/> MA Marokko   | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine                        |
| <input checked="" type="checkbox"/> DM Dominica                       | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republik Moldau                                 | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda                         |
| <input checked="" type="checkbox"/> DZ Algerien                       |  | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input checked="" type="checkbox"/> EC Ecuador                        | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagaskar                                      |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estland                        | <input checked="" type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Usbekistan                     |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spanien                        | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolei  | <input checked="" type="checkbox"/> VN Vietnam                        |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finnland                       | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi  | <input checked="" type="checkbox"/> YU Jugoslawien                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich         |  | <input checked="" type="checkbox"/> ZA Südafrika                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada                        |  | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Simbabwe                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgien                       |  |   |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten, die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind.

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung (einschließlich der Gebühren) muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH				
Die Priorität der folgenden früheren Anmeldung(en) wird hiermit in Anspruch genommen:				
Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen der früheren Anmeldung	Ist die frühere Anmeldung eine:		
		nationale Anmeldung: Staat	regionale Anmeldung: regionales Amt	internationale Anmeldung: Anmeldeamt
Zeile (1) (30.05.01) 30. Mai 2001	[DE]10127572.2	DE		
Zeile (2)				
Zeile (3)				
Zeile (4)				
Zeile (5)				

☐ Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben.

Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist (sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist):

☐ sämtliche Zeilen ☒ Zeile (1) ☐ Zeile (2) ☐ Zeile (3) ☐ Zeile (4) ☐ Zeile (5) ☐ weitere, siehe Zusatzfeld

\* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, geben Sie mindestens einen Staat an, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums oder Mitglied der Welthandelsorganisation ist und für den oder das die frühere Anmeldung eingereicht wurde.....

Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE			
Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA) (falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden):			
ISA / ... EPA			
Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist):			
Datum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Staat (oder regionales Amt)	

Feld Nr. VIII ERKLÄRUNGEN		
Die Felder Nr. VIII (i)-bis (v) enthalten die folgenden Erklärungen (Kreuzen Sie unten die entsprechenden Kästchen an und geben Sie in der rechten Spalte für jede Erklärung deren Anzahl an):		Anzahl der Erklärungen
<input type="checkbox"/> Feld Nr. VIII (i)	Erklärung hinsichtlich der Identität des Erfinders	
<input type="checkbox"/> Feld Nr. VIII (ii)	Erklärung hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, zum Zeitpunkt des internationalen Anmeldedatums, ein Patent zu beantragen und zu erhalten	
<input type="checkbox"/> Feld Nr. VIII (iii)	Erklärung hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, zum Zeitpunkt des internationalen Anmeldedatums, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen	
<input type="checkbox"/> Feld Nr. VIII (iv)	Erfindererklärung (nur im Hinblick auf die Bestimmung der Vereinigten Staaten von Amerika)	
<input type="checkbox"/> Feld Nr. VIII (v)	Erklärung hinsichtlich unschädlicher Offenbarungen oder Ausnahmen von der Neuheitsschädlichkeit	

**Feld Nr. IX KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE**

Diese internationale Anmeldung enthält:

(a) die folgende Anzahl an Blättern Papier:

Antrag (inklusive Erklärungsblätter) : 05  
 Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) : 50  
 Ansprüche : 04  
 Zusammenfassung : 01  
 Zeichnungen : 01  
 Teilanzahl : 61

Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Anzahl der Blätter, soweit auf Papier eingereicht wird, unabhängig davon, ob zusätzlich auch in computerlesbarer Form eingereicht wird) : \_\_\_\_\_

Gesamtanzahl : 61

(b) Sequenzprotokollteil der Beschreibung in computerlesbarer Form eingereicht

- (i) ☐ ausschließlich in dieser Form (nach Abschnitt 801(a)(i))  
 (ii) ☐ zusätzlich zur Einreichung auf Papier (nach Abschnitt 801(a)(ii))

Art und Anzahl der Datenträger (Diskette, CD-ROM, CD-R oder sonstige), auf denen der Sequenzprotokollteil enthalten ist (zusätzlich eingereichte Kopien unter Punkt 9(ii) in der rechten Spalte angeben):

Dieser internationalen Anmeldung liegen die folgenden Unterlagen bei (kreuzen Sie die entsprechenden Kästchen an und geben Sie in der rechten Spalte jeweils die Anzahl der beiliegenden Exemplare an)

Anzahl

1. ☐ Blatt für die Gebührenberechnung
2. ☐ Original einer gesonderten Vollmacht
3. ☐ Original einer allgemeinen Vollmacht
4. ☐ Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden)
5. ☐ Begründung für das Fehlen einer Unterschrift
6. ☐ Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer(n) gekennzeichnet:
7. ☐ Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache:
8. ☐ Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material
9. ☐ Sequenzprotokoll in computerlesbarer Form (geben Sie zusätzlich die Art und Anzahl der beiliegenden Datenträger an (Diskette, CD-ROM, CD-R oder sonstige))
  - (i) ☐ Kopie ausschließlich für die Zwecke der internationalen Recherche nach Regel 13ter (und nicht als Teil der internationalen Anmeldung)
  - (ii) ☐ (nur falls Feld (b)(i) oder (b)(ii) in der linken Spalte angekreuzt wurde) zusätzliche Kopien einschließlich, soweit zutreffend, einer Kopie für die Zwecke der internationalen Recherche nach Regel 13ter
  - (iii) ☐ zusammen mit entsprechender Erklärung, daß die Kopie(n) mit dem in der linken Spalte aufgeführten Sequenzprotokollteil identisch ist (sind)
10. ☐ Sonstige (einzeln auflisten):

Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.):

Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird: deutsch

**Feld Nr. X UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS, DES ANWALTS ODER DES GEMEINSAMEN VERTRETERS**

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.



Helmut WEHLAN, Patentanwalt

Vom Anmeldeamt auszufüllen

1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	30. Mai 2002	2. Zeichnungen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:		<input checked="" type="checkbox"/> eingegangen:
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:		<input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind): ISA/EP	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben	

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:



## Werkzeuge zur Diagnostik, molekularen Definition und Therapieentwicklung chronischer entzündlicher Gelenkerkrankungen

5

### Beschreibung

Die Erfindung betrifft Werkzeuge zur Diagnostik, molekularen Definition und Therapie-Entwicklung chronischer entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser

10 Erkrankungen auf der Grundlage von Genomdaten (Genomics), Proteomdaten (Proteomics) und Immunomdaten (Immunomics) in der Analyse und Therapie-Entwicklung bei chronischen Gelenkerkrankungen. Die Erfindung beruht auf der Verwendung von Gensequenzen sowie abgeleiteten mRNAs und Proteinen sowie auf Antikörpern mit Spezifität für die abgeleiteten Proteine zur Charakterisierung von entzündlich-rheumatischen und nicht-entzündlichen rheumatischen

15 Gelenkerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Infektionserkrankungen. Aus den Untersuchungen können ätiologisch bedeutsame Pathogenitätsprinzipien der bislang ungeklärten chronisch-entzündlichen Gelenkerkrankungen abgeleitet werden. Ferner können Interpretationsalgorithmen zur Klassifikation, Prognosebeurteilung und Therapieoptimierung dieser Gelenkerkrankungen aufgebaut und neue Therapiestrategien und Angriffspunkte für Medikamente

20 abgeleitet werden.

### Charakteristik des bekannten Standes

#### Problemstellung

Chronisch entzündliche Gelenkerkrankungen sind ätiologisch nicht geklärt. Die rheumatoide Arthritis (RA - Abkürzungsverzeichnis hinter den Beispielen) ist der klassische Vertreter dieser Erkrankungen. Wesentliche Krankheitsabläufe finden in der entzündlich veränderten Synovialmembran statt und führen zur chronischen Gelenkschädigung. Das klinische Erscheinungsbild präsentiert sich sehr heterogen und legt nahe, dass es sich um verschiedene Entitäten mit dem gemeinsamen Symptom der destruktiven Synovitis handelt. Diese Erkrankungen sind auch als systemische Erkrankungen zu

30 verstehen, bei denen zahlreiche Veränderungen im Blut beobachtet werden und mitunter schwerwiegende Organmanifestationen auftreten können.

Überschießende Entzündungsaktivitäten durch Fehlregulationen in der Entzündungskaskade werden als hauptverantwortliche Pathomechanismen diskutiert. Ferner werden Autoimmunreaktionen beschrieben, die eine Beteiligung des spezifischen humoralen und zellulären Immunsystems am

35 Krankheitsprozeß nahelegen. Es werden jedoch auch andere Mechanismen wie enzymatische Gewebeerstörung, Zell- und Gewebeproliferation oder Regeneration diskutiert, die in der Pathogenese ebenfalls eine wichtige Rolle spielen könnten.

Ob diese genannten Pathomechanismen die einzigen und alleinrelevanten sind, konnte bislang nicht abschließend geklärt werden. Auch ist unbekannt, welche Parameter all diese Veränderungen gleichzeitig erfassen können. Als Folge des ungenügenden pathophysiologischen Verständnisses existieren zwar viele Medikamente, die Hauptvertreter verfolgen jedoch nur ein wesentliches

#### 5 Therapiekonzept:

Orientierend an dem gemeinsamen Symptom der überschießenden Entzündung zielt die aktuelle Therapie nämlich auf die Unterdrückung der Entzündung ab. So genannte Basistherapien besitzen immunmodulatorischen und krankheitsmodifizierenden Charakter. Sie greifen in Grundmechanismen des Zellstoffwechsels und der Zellaktivität ein (z.B. Methotrexat, Azathioprin). Die umfassenden  
10 Prinzipien der molekularen Wirkungsweise dieser Therapien bei den Gelenkerkrankungen sind jedoch nur unzureichend bekannt. Deshalb fehlen auch entsprechende Parameter, um die Therapieeffizienz einzelner Basistherapien differentiell und spezifisch im Individualfall zu kontrollieren.

#### *Bisherige Werkzeuge*

Patienten mit Gelenkentzündung werden im klinischen Alltag heute nach folgenden Kriterien  
15 beurteilt: berichteter Krankheitsverlauf (Anamnese), klinische Untersuchung (Befallsmuster der Gelenke, Organbefall), Entzündungsparameter (unspezifische Entzündungshinweise aus der Serumelektrophorese, der Blutsenkung und dem C-reaktiven Protein), Autoimmunparameter (Rheumafaktor, antinukleäre Antikörper und wenige spezielle Autoantikörper wie anti-Ro, -La, -U1RNP, -Sm, -Histon, -Scl70, -Centromer, -dsDNA, -Phospholipid-Antikörper), genetische  
20 Disposition über HLA-Marker (DR4, B27, DR3), Bildgebung (destruktive Veränderungen in den Röntgenbefunden der Gelenke), erweiterte Organdiagnostik durch Routineparameter der Labordiagnostik (Leberenzyme, Muskelenzyme, Nierenretentionswerte) und ggf. weiterführende sonographische, radiologische und magnetresonanztomographische Techniken. Diese liefern nur sehr eingeschränkt Aussagen über die prognostisch zu erwartende Aggressivität der Erkrankung oder die  
25 konkrete Erfolgsaussicht eines Basistherapeutikums im individuellen Krankheitsfall. Zudem sind die Diagnosekriterien heute nicht darauf ausgelegt, die Vielfalt der Erscheinungsformen innerhalb der häufigsten Arthritis-Erkrankung, der RA, ausreichend zu klassifizieren (1 - Referenzen hinter den Beispielen). Insbesondere in der Frühphase der Erkrankung ist die Diagnosestellung schwierig und unsicher. Aber bereits nach einem Jahr Krankheitsdauer sind bei der Mehrzahl der Patienten  
30 irreversible Gelenkschädigungen eingetreten. Aus Früh-Arthritis-Studien ist bekannt, dass eine frühere Sicherung der Diagnose, gefolgt von einer adäquaten Therapie, entscheidende Verbesserungen in der langfristigen Entwicklung der Erkrankung mit sich bringt. Es werden deshalb dringend neue Methoden und Kriterien benötigt, die über das klinische Bild hinausgehend molekulare Merkmale integrieren.

35 Auch die Verlaufskontrolle für den Therapie-Erfolg wird bislang mit Hilfe von oben genannten Methoden der Diagnostik durchgeführt. Viele dieser Parameter verändern sich nur sehr langsam. Sie

erfordern viele Wochen bis Monate Verlaufsbeobachtung, um die Aussage zu treffen, ob das gewählte Medikament wirksam ist. Nicht selten muss wegen mangelhafter Besserung und Progredienz der Erkrankung auf ein anderes Medikament umgestellt werden. Grundsätzlich ist eine Heilung der Erkrankungen mit den derzeit verfügbaren Medikamenten nicht möglich.

## 5 Experimentelle Ansätze

Über die etablierten Werkzeuge hinaus gibt es zahlreiche experimentelle Ansätze, die Diagnostik insbesondere der RA zu verbessern.

Dies betrifft die Suche nach Schlüsselproteinen, die 1.) den Entzündungsablauf in einer zentralen Position aufrechterhalten bzw. verhindern können, die 2.) maßgeblich an der enzymatischen Zerstörung der Knorpel- und Knochenmatrix beteiligt sind bzw. diese Enzyme inhibieren oder die 3.) regenerative und reparative Prozesse induzieren bzw. deren Gegenspieler inhibieren können. So zeigt sich die Rolle der entzündungsvermittelnden Zytokine Tumornekrosefaktor (TNF-) alpha und Interleukin (IL-) 1 beta als wesentlich und hat entsprechende Therapieansätze in die klinische Anwendung gebracht. Obgleich eine Hemmung von TNF-alpha in vielen Fällen eine mit herkömmlichen Mitteln nicht ausreichend beeinflussbare RA lindern kann, führen die Erfolge dennoch nicht zu einer Heilung der Erkrankung. Zum Teil ist die Hemmung so stark, dass Infektionen oder gar septische Komplikationen entstehen und dennoch keine ausreichende Kontrolle der Arthritis erreicht wird. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass der TNF-alpha-Entzündungsweg zumindest nicht der einzige zentrale Pathomechanismus der Erkrankung sein kann. Neben den beiden Zytokinen wird die Rolle zahlreicher weiterer Botenstoffe in der Pathogenese der Arthritis untersucht. Zudem treten die angeschlossenen intrazellulären Signalwege zunehmend in das Blickfeld therapeutischer Interventionsmöglichkeiten.

Ferner stehen Matrixmetalloproteinasen und Cathepsine im Mittelpunkt der enzymatischen Zerstörung von Knorpel und Knochen.

Untersuchungen zu regenerativen Mechanismen stehen erst am Anfang der Erforschung. Vorrangig sind hier Botenstoffe aus der Transforming Growth Faktor (TGF-) beta-Familie zu benennen. Eine Vielzahl dieser Vertreter spielt eine große Rolle in der Entwicklung des Bewegungsapparates. Erste Untersuchungen an Synovialgewebe und Knorpel haben gezeigt, dass Vertreter dieser Gruppe von Wachstumsfaktoren und Morphogenen auch im erwachsenen Synovialgewebe produziert werden. Bei entzündlichen Gelenkerkrankungen konnte in eigenen Untersuchungen gezeigt werden, dass einzelne dieser Faktoren offensichtlich relativ erniedrigt sind. Ferner konnte für Bone Morphogenetic Protein (BMP-) 7 gezeigt werden, dass die zelluläre Invasion in sich formierendes künstliches Knorpelgewebe unterdrückt wird (2).

Viele der genannten Faktoren und Enzyme sind auch bei anderen Gelenkerkrankungen wie der Osteoarthritis oder den reaktiven Arthritiden zu finden und stellen für sich betrachtet keinen diagnostisch wegweisenden Parameter dar.

5 Die experimentellen Ansätze zielen auch darauf ab, dass bei der RA autoreaktive T- und B-Zellen auftreten und die Erkrankung zu den Autoimmunerkrankungen gezählt wird. Dies geht zurück auf die Entdeckung des sogenannten Rheumafaktors, eines Autoantikörpers, der gegen Immunglobulin G gerichtet ist. Rheumafaktoren treten jedoch nur bei etwa zwei Drittel der RA-Patienten auf, dafür aber auch bei anderen rheumatischen und nicht-rheumatischen Erkrankungen und sogar in bis zu 5% der  
10 Gesunden (mit zunehmendem Lebensalter noch deutlich darüber). Das Auftreten von Rheumafaktoren scheint unter bestimmten pathologischen Gegebenheiten, wie z.B. der bakteriellen Endokarditis, eine physiologische Reaktion des Körpers zu sein. Autoreaktive B-Zellen mit Spezifität für IgG liegen offenbar bei einem Großteil der Bevölkerung vor und können durch unterschiedliche Mechanismen aktiviert werden. Der Begriff "Rheumafaktor" ist dennoch erhalten geblieben, weil sich lediglich für die RA eine diagnostische und prognostische Bedeutung ergibt.

15 Gleiche Charakteristika gelten aber qualitativ für nahezu alle bislang bekannten Autoantikörper bei der RA: eine Frequenz der positiven Patienten liegt deutlich unter 100% und die Krankheitsspezifität teilweise ebenfalls deutlich unter 100%. Der klinisch ausgeprägten Heterogenität der RA in Befallsmuster, Intensität der Entzündung und schubweisem Verlauf steht somit eine Heterogenität der immunologisch fehlregulierten Prozesse gegenüber. Diese klinische und immunologische  
20 Heterogenität unterstützt ebenfalls die Vermutung, dass die "rheumatoide Arthritis" ein Sammelbegriff für unterschiedliche Krankheitsentitäten sein könnte. Als Paradebeispiel dient hier die Unterscheidung in RF-positive und -negative (RF – Rheumafaktoren) RA, wobei der ersteren Form ein schwererer Verlauf mit höherem Destruktionspotential und systemischer humoraler Aktivität nachgesagt wird. Der Begriff seronegativ impliziert fälschlicherweise sogar das Fehlen jeglicher Autoantikörper. Aber weder für den Rheumafaktor noch für irgendeine der bekannten Autoreaktivitäten konnte bislang eine Ursächlichkeit für die Entstehung der RA oder einer ihrer postulierten Untergruppen oder Verlaufsformen nachgewiesen werden.

Autoantikörper werden bei anderen rheumatischen Autoimmunerkrankungen wie den Kollagenosen mit dem systemischen Lupus erythematoses (SLE) als Hauptvertreter zur diagnostischen Einteilung  
30 verwendet. Eine primäre Pathogenität dieser Autoantikörper wird immer wieder diskutiert. Sicher ist bei hohem Autoantikörper-Titer in Verbindung mit einer unkontrollierten überschießenden Freisetzung von Autoantigenen im Krankheitsschub die daraus folgende Immunkomplexbildung und Komplementaktivierung mit Organschädigungen insbesondere der Niere und vaskulitischen Merkmalen assoziiert. Die Bedeutung autoreaktiver B- und T-Zellen für die RA ist jedoch ungeklärt.  
35 Stattdessen werden immer neue Autoantigene als Ziele einer autoreaktiven Immunantwort bei der RA beschrieben. Einige dieser Antigene sind biochemisch und in Bezug auf ihre Antigenität gut charakterisiert, von anderen hingegen sind erst wenige Parameter bekannt. Für ihre Entdecker waren



einige Autoantikörper sehr vielversprechend, weil B- und/oder T-Zell-Antwort scheinbar hoch RA-spezifisch waren. Das Interesse an diesen Antikörpern nahm aber dann immer schnell ab, wenn dieselben Autoreaktivitäten auch bei anderen Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden konnten. Mittlerweile sind zahlreiche T-zelluläre Autoreaktivitäten bei der RA charakterisiert, von denen nur die wenigsten RA-spezifisch sind.

### *Heatshock Proteine*

Die RA wurde früh in den Verdacht gebracht, eine Infektionserkrankung zu sein. Es wurden daher diverse xenogene – meist mikrobielle und virale – Antigenquellen untersucht, um potentielle Erreger als Trigger für Autoreaktivität nachzuweisen. Eines der potentiell RA-induzierenden Agenzien war *Mycobacterium tuberculosis*, weil es im Tiermodell die Adjuvans-Arthritis induziert, eine Erkrankung, die in gewissen Aspekten der menschlichen RA ähnelt. Diese experimentelle Erkrankung konnte auch ausgelöst werden durch mykobakterielles Heatshockprotein 65 (mt-Hsp65) oder mit T-Zellen, die für dieses Antigen spezifisch sind. Heatshockproteine helfen natürlichen Proteinen bei der korrekten Faltung und erzeugen Tertiär- und Quartärstrukturen. mt-Hsp65 ist homolog zu dem essentiellen Hsp60 bei Säugern. Berichte über mt-Hsp65-spezifische T-Zellen und Antikörper in Synovialflüssigkeit von RA-Patienten legten nahe, dass das stark homologe humane Hsp60 als Autoantigen bei RA-Patienten erkannt würde. Jedoch sind diese Antikörper nicht RA-spezifisch: Sie treten auch bei Patienten mit Reiter-Syndrom, SLE und aktiver Tuberculose, wie auch bei Gesunden auf.

Obwohl die Reaktivität gegen mt-Hsp65 bei der RA keine dominante Rolle zu spielen scheint, könnte humanes Hsp60 dennoch in der Pathogenese der RA bedeutsam sein: In seiner Aminosäuresequenz besitzt humanes Hsp60 eine Identität über Bereiche von 11 bis 22 Aminosäuren mit Proteinen wie Cytokeratin und Hsp90. Es ist daher denkbar, dass autoreaktive T-Zellen oder Antikörper gegen diese Proteine ursprünglich von einer natürlich auftretenden – aber strikt regulierten – Hsp60-Reaktivität herrühren.

### *Dna J*

Dna J, das bakterielle Stressprotein mit Homologie zu dem Säuger-Hsp70, weist die Aminosäuresequenz QKRAA auf, bekannter unter dem Namen *Shared Epitope*, welches für die RA prädisponiert (3). Dieses Epitop kommt ebenfalls in dem Epstein-Barr-Virus (EBV)-kodierte Protein gp110 vor. Dna J ist das Ziel autoreaktiver T-Zellen bei RA, nicht aber bei Gesunden (4). Obwohl noch unbekannt ist, wie Shared Epitope für die RA prädisponiert, ist ein denkbarer Mechanismus die Erzeugung des Shared Epitope-Peptides aus Nicht-MHC-Proteinen und deren anschließenden Präsentation auf MHC Klasse II-Molekülen unter Auslösung einer Immunantwort gegen Fremd (EBV-gp110) und Selbst (MHC Klasse II).

### *EBV-codiertes nukleäres Antigen*

Epstein-Barr-Virus (EBV) ist schon früh in den Verdacht geraten, die RA auszulösen, obwohl es erst jüngst in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten nachgewiesen werden konnte. Ein Antikörper, gerichtet gegen das EBV-kodierte nukleäre Antigen (EBNA-1), zeigte starke Reaktivität mit einem p62-Protein aus synovialen Deckzellen bei Patienten mit RA. EBNA-1 beinhaltet eine Glycin-Alanin-reiche Repeat-Sequenz (IR-3), die von Autoantikörpern bei Patienten mit RA, SLE, systemischer Sklerose (SSc) und infektiöser Mononucleose sowie bei gesunden Individuen mit vergleichbaren Häufigkeiten erkannt werden. EBNA-1 weist Kreuzreaktivität mit zahlreichen humanen Proteinen auf, typischerweise über die IR-3-Sequenz. Darunter sind im wesentlichen p62 und p542, wobei das letztere hauptsächlich von Antikörpern aus Patienten mit infektiöser Mononucleose, aber auch aus RA-Patienten erkannt wird. p542 wurde jüngst als 71k-Komponente von hnRNPs identifiziert aufgrund seiner hohen Sequenzidentität mit dem Maus-hnRNP namens Raly und Ähnlichkeiten mit dem humanen hnRNP C2.

### *Sa-Antigen; Filaggrin, citrullinierte Peptide/Proteine*

Das Sa-Antigen (5), wie auch Filaggrin sind zwei seit neuerem bekannte Antigene, die nicht im entzündeten Gelenk vorkommen, aber die Aufmerksamkeit wegen der sehr RA-spezifischen Immunantwort auf sich zogen. Das Sa-Antigen ist ein 50k-Protein aus humaner Milz und Placenta. Sa-spezifische Antikörper kommen bei 43% der RA-Patienten vor und haben eine Krankheitsspezifität von 78% bis 99%. Filaggrin ist ein 42k-Protein, das intermediäre Filamente, insbesondere Cytokeratin, vernetzt und im Endothel vorkommt. Filaggrin-spezifische Antikörper scheinen die gleichen zu sein, wie der lange zuvor beschriebene "Antiperinukleäre Faktor" und die sogenannten Antikeratin-Antikörper. Die Hauptdeterminante des oder der Epitope, die von Anti-Filaggrin-Antikörpern erkannt werden, ist Citrullin, ein posttranslationell modifiziertes Arginin (6, 7). Die Sensitivität dieser Antikörper liegt zwischen 36% und 91% und die Spezifität zwischen 66% und 100%. Obwohl Filaggrin nur extra-artikulär vorkommt, konnte Citrullin mittlerweile auch in Synovialzellen nachgewiesen werden.

### *Collagen II*

Collagen Typ II ist eine wesentliche Komponente des Gelenkknorpels und erscheint daher prädisponiert als Autoantigen für die RA. Folgerichtig haben sich viele Studien mit der Rolle der Collagen-spezifischen Immunantwort beschäftigt. Maus-T-Zellen, die mit bovinem Collagen Typ II reagieren, sind spezifisch für ein Epitop, das auch in humanem Collagen II vorkommt und darüber hinaus auch mit einem wichtigen T-Zell-Epitop aus Mäusen mit Collagen-induzierter Arthritis überlappt. Collagen Typ II ist eine Komponente der extrazellulären Matrix, die Tripelhelices aus identischen Tropocollagen-Untereinheiten ausbildet, die wiederum aus dem noch größeren Procollagen prozessiert werden. B-Zellen mit Spezifität für Collagen scheinen in den entzündeten

Gelenken von Patienten mit RA vermehrt aufzutreten. Collagen II-spezifische T-Zellen treten sowohl bei RA-Patienten wie auch bei Gesunden auf.

Besonderes Interesse galt der Collagen-Reaktivität im Rahmen der oralen Toleranz-Studien bei RA. Orale Toleranz kann im Tiermodell durch Antigene erzeugt werden, die in dem Kompartiment der (autoimmunen) Entzündung vorkommen, aber nicht notwendigerweise selbst in das Entzündungsgeschehen involviert sind. Wird ein solches Antigen oral appliziert, werden offenbar T-Zellen mit Spezifität für das gefütterte Antigen toleriert und können dann an anderem Ort, dem entzündeten Gelenk, über suppressive Faktoren, z.B. IL-10 und TGF- $\beta$ , die sogenannte Bystander-Suppression erzeugen. Derart Collagen II-spezifische T-Zellen sollten die Entzündung bei RA heruntermodulieren. Jedoch haben drei Placebo-kontrollierte Doppelblindstudien zu oraler Toleranz durch die Applikation von Collagen II keine bemerkenswerte Verbesserung der Krankheitsaktivität ergeben. Ähnliches gilt bislang für die klinischen Studien mit Peptiden aus Hsp65 (Subreum).

#### *Chondrozyten Antigen 65 (CH65)*

Chondrozytenmembranen wurden als Ziel autoreaktiver T-Zellen bei RA- und Arthrose-Patienten beschrieben (8), wohingegen T-Zellen normaler Spender nicht reagierten. Darüber hinaus werden Chondrozytenmembranen bei 70% der RA-Patienten von Autoantikörpern erkannt. Antigen ist das knorpelspezifische CH65, welches eine Sequenzähnlichkeit zu mykobakteriellem Hsp65 und bestimmten Cytokeratinen aufweist. CH65 besitzt einen hohen Anteil an Glycin - ähnlich wie, aber nicht identisch mit Hsps. Die Sequenzen ähneln zwar denen von Cytokeratinen, sind aber dennoch völlig untypisch für diese. Solche Ähnlichkeiten verlocken zu der Annahme eines molekularen Mimikry zwischen mykobakteriellen und humanen Hsps mit anderen Proteinen. Dennoch findet sich keinerlei Kreuzreaktivität zwischen monoklonalen Antikörpern mit Spezifität für CH65, Cytokeratin oder Hsp65. T-Zell-Reaktivität wurde nur gegen ungereinigte Chondrozytenmembranen untersucht.

#### *HC gp39*

In der Synovialflüssigkeit treten viele Autoantigene auf, die nur bei kleinen Patienten- und Kontroll-Kohorten getestet wurden. Ein Beispiel ist das Human Cartilage Glycoprotein (HC gp39), ein wichtiges Produkt, das von artikulären Chondrozyten, Synovialzellen, Makrophagen später Differenzierungsstadien und Neutrophilen sezerniert wird. Der gp39-Spiegel ist bei Patienten mit degenerativer Gelenkerkrankung verglichen mit Gesunden in Serum und Synovialflüssigkeit erhöht. Später wurde gezeigt, dass ein erhöhter Titer nicht nur bei Osteoarthritis, sondern auch bei kolorektalem Karzinom, alkoholbedingter Leberzirrhose und Brustkrebs auftritt. gp39 hat nicht nur eine Bedeutung bei dem Umbau von Gewebe und der Degradation der extrazellulären Matrix, sondern es ist auch Ziel autoreaktiver T-Zellen bei der RA. Demzufolge sind auch Peptide aus der gp39-Sequenz daraufhin getestet worden, HLA-DR4 (DRB1\*0401) zu binden und T-Zellen zu stimulieren. gp39-reaktive T-Zellen konnten bei 8 von 18 RA-Patienten und 3 von 11 Gesunden nachgewiesen

werden. Im Tiermodell führt eine Immunisierung von Balb/c-Mäusen zu einer chronischen Arthritis mit Schüben, die wiederum mit nasaler Applikation des gp39 kuriert werden konnte.

### *Rheumafaktor*

Das bestbekannte Autoantigen der RA ist zugleich nicht gewebespezifisch, sondern kann nahezu ubiquitär auftreten. Es ist das Immunglobulin G (IgG) als das Ziel weiterer Antikörper, der sogenannten Rheumafaktoren (RF). Der Rheumafaktor ist nach wie vor der einzige serologische Parameter, der in den American College of Rheumatology (ACR)-Kriterien enthalten ist. Die pathologische Relevanz der RF für die RA wird immer noch kontrovers diskutiert, weil RF auch bei Patienten mit SLE, Sjögren Syndrom, Endokarditis, Lebererkrankungen und sogar bei Gesunden vorkommen. Der RF-Titer ist nicht streng mit klinischer oder serologischer Aktivität der RA oder der Gelenkzerstörung korreliert.

### *hnRNP A2-Protein (RA33)*

Das A2-Protein von humanen nukleären Ribonukleoproteinen (hnRNPs) ist ein ubiquitäres Protein, das ursprünglich als RA33 Autoantigen beschrieben wurde. Nachfolgend wurde dessen Identität mit der A2-Komponente gezeigt wie auch die Reaktivität mit Seren von Patienten mit SLE, Mischkollagenosen (Mixed Connective Tissue Disease; MCTD) und anderen. A2 ist mit zahlreichen anderen Faktoren komplexiert, die zusammengesetzt die hnRNPs im Zellkern ausmachen. Die exakte Funktion des A2 ist unbekannt, jedoch nimmt man eine Funktion beim Splicen der humanen nukleären Ribonukleinsäure (hnRNA) an. Daher hat A2 auch zwei RNA-Bindungsdomänen sowie ein Kernimport/-export-Signal. Antikörper bei RA und SLE richten sich gegen die Region zwischen den RNA-Bindungsdomänen, während die von MCTD-Patienten (Mixed Connective Tissue Disease – Mischkollagenose) ein diskontinuierliches Epitop erkennen, das sich aus beiden RNA-Bindungsdomänen zusammensetzt. Es ist noch nicht klar, wie das Immunsystem mit A2 in Kontakt kommt. Aus Sicht des Homunculus sind jedoch hnRNPs gute Kandidaten-Antigene für die RA. Bislang lässt sich aber nur spekulieren, dass unter bestimmten Umständen A2 an die Zelloberfläche gelangt, so z.B. beim Zerfall von Zellen im Rahmen einer Entzündung.

### *Calpastatin*

Calpastatin ist ein ubiquitäres zytoplasmatisches Protein mit einer molekularen Masse von 72k und vier inhibitorischen Domänen für Calpaine. Calpaine umfassen eine Familie von Cystein-Proteasen, die unter dem Verdacht stehen, an der Gelenkzerstörung bei rheumatischen Erkrankungen beteiligt zu sein. Calpaine kommen zytoplasmatisch vor und sind stringent reguliert durch Calciumionen für die Aktivierung und durch Calpastatin für die Inhibition. Nach Aktivierung von Zellen kommt Calpastatin auch extrazellulär vor und ist derart für Antikörper zugänglich. Calpastatin wird durch Autoantikörper erkannt bei Patienten mit RA, SLE, Polymyositis/Dermatomyositis (PM/DM), MCTD, aktivierter Arthrose und venöser Thrombose. Im Tiermodell an Calpastatin-defizienten Ratten lassen sich keine

Symptome einer Arthritis auslösen. Calpastatin, Calpaine und Calpastatin-spezifische Antikörper kommen in den entzündeten Gelenken von RA- und OA-Patienten vor und können daher in die Pathogenese dieser Erkrankungen involviert sein.

### *Calreticulin*

5 Calreticulin ist ein ubiquitäres Protein des endoplasmatischen Reticulum (ER), welches unter bestimmten Bedingungen auch im Zellkern, dem Zytoplasma und auf der Zelloberfläche vorkommt. Es ist ein hoch konserviertes  $\text{Ca}^{++}$ -bindendes Protein. Calreticulin ist das Ziel von Autoantikörpern bei verschiedenen Erkrankungen autoimmunen oder entzündlichen Ursprungs, im wesentlichen bei SLE und Onchozerkose, aber auch bei RA. Schließlich bindet der RA-assoziierte Haplotyp DR4Dw4/DR53  
10 ein Peptid aus Calreticulin.

### *BiP (Heavy Chain Binding Protein)*

Ein weiteres vielversprechendes Zielantigen für den Homunculus der RA ist das ubiquitäre BiP (Binding Protein), das ursprünglich als Heavy Chain Binding Protein beschrieben wurde, da es mit den schweren Ketten von Immunglobulinen interagiert. BiP ist selbst ein residentes ER-Protein und besitzt  
15 eine Peptidsequenz, die dafür sorgt, dass es normalerweise nicht exportiert wird. Mittlerweile ist bekannt, dass BiP ein sogenanntes molekulares Chaperon (Anstandsdame) ist und als solches mit den meisten Proteinen interagiert, die in das endoplasmatische Reticulum (ER) befördert werden und den sekretorischen Weg beschreiten. Über diese essentielle Funktionalität hinaus wird BiP durch Stressfaktoren wie Schwermetallionen oder Agenzien, die den Calciumionen-Haushalt der Zelle oder  
20 die Integrität der Proteinbiosynthese beeinflussen, überexprimiert. Es kann unter diesen Bedingungen dann sogar im Zellkern, aber auch auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

BiP ist das Ziel autoreaktiver Antikörper und T-Zellen bei 66% der RA-Patienten und ursprünglich vor dem Hintergrund der RA als p68 beschrieben. Die Krankheitsspezifität dieser Autoantikörper liegt mit 99% extrem hoch. Das Antigen ist O-glykosyliert, und es wird spekuliert, dass diese Modifikation eine  
25 regulatorische Funktion wie Mono-O-GlcNAc bei vielen anderen Proteinen haben könnte. In diesen Proteinen ist der Schalter von der O-GlcNAc zur O-Phosphat-Modifikation mit einem Wechsel des Aktivierungszustandes oder des zellulären Kompartments gekoppelt. Ähnlich könnte ein stressinduzierter Shift des BiP von ER zu Kern oder Zelloberfläche von pathogenetischer Bedeutung sein. Die eher unnatürliche Präsenz von BiP auf der Zelloberfläche könnte als Alarm- und  
30 Aktivierungssignal für andere Zellen gelten, so auch für Zellen des Immunsystems. Bei der RA könnte eine solche Aktivierung durch eine lokale Infektion oder durch anderweitig entzündlich beschädigtes Gewebe geschehen. BiP könnte durch Zell- oder Gewebebeschädigung auf die Oberfläche geschädigter Zellen gelangen und dort dann Ziel autoreaktiver T-Zellen werden. Es gibt Anzeichen dafür, dass diese BiP-reaktiven T-Zellen auch natürlicherweise vorkommen, welche nach Abklingen  
35 der verursachenden Bedingungen durch regulatorische T-Zellen wieder herunterreguliert werden. Diese regulatorischen Zellen sind antigenspezifisch und HLA-restringiert. Dabei ist offenbar die HLA-

Restriktion der regulatorischen T-Zellen unterschieden von der HLA-Restriktion der Effektor-T-Zellen und lässt sich spezifisch inhibieren. Hier könnte insbesondere auch wieder das Epitop O-GlcNAc eine besondere Rolle spielen: Es ist gut denkbar, dass dieses Epitop nicht nur Ziel der Autoantikörper- sondern auch der T-Zell-Antwort ist.

5 p205

Ein weiteres Protein, das aus Synovialflüssigkeit isoliert wurde, dessen Funktion jedoch weit über dieses Kompartiment hinaus geht, ist das p205-Antigen. Es ist Ziel autoreaktiver T-Zellen bei RA-Patienten. p205 wird auch in der Synovialmembran exprimiert und ist wahrscheinlich dasjenige Antigen mit der höchsten T-Zell-stimulatorischen Kapazität bei der RA überhaupt und erreicht teilweise sogar die Proliferationsrate, die mit Synovialflüssigkeit oder gar mit dem Lektin Phytohämagglutinin (PHA) erzielt werden kann. Die Funktion des p205-Antigens ist noch unbekannt. Es besitzt jedoch eine 11 Aminosäuren lange Sequenz, die identisch mit einem Bereich aus IgG ist, nämlich in der Region zwischen den konstanten Domänen C<sub>H2</sub> und C<sub>H3</sub>, einem Bereich, in dem Rheumafaktoren binden. Dieser Bereich des p205 wird sowohl von monoklonalen Rheumafaktoren gebunden als auch von autoreaktiven T-Zellen erkannt. Ferner leisten p205-spezifische T-Zellen bei Stimulation mit cognatem Antigen B-Zell-Hilfe zur Sekretion von Rheumafaktoren. Es ist daher anzunehmen, dass hiermit erstmalig ein Antigen gefunden ist, das T-Zell-Reaktivität aufweist und darüber hinaus in der Lage ist, B-Zellen mit Spezifität für IgG Hilfe zur Affinitätsreifung zu geben. Im Gegensatz dazu konnte eine T-Zell-Reaktivität gegen intaktes IgG oder IgG-Fragmente bislang nicht gefunden werden. Möglicherweise handelt es sich bei der Aminosäuresequenz des p205 um ein Peptid, das *in vivo* bei der Prozessierung von IgG offenbar nicht oder in nicht ausreichenden Mengen entsteht. Somit erscheint es wahrscheinlich, dass Autoreaktivität gegen p205 die Produktion von Rheumafaktoren bei der RA induziert.

25

Diese Zusammenstellung RA-assoziiierter Autoreaktivitäten zeigt, dass viele verschiedene Autoantigene im Verlauf der RA zum Ziel des Immunsystems werden. Diese werden in mehr oder weniger starkem Ausmaß auch bei anderen rheumatischen und nicht-rheumatischen Erkrankungen, bis hin zum gesunden Zustand, Ziel des Immunsystems. Es bleibt somit festzustellen, dass nach dem Stand der Technik keine Autoreaktivität für sich alleine genommen geeignet ist, die Diagnostik der RA, weder in den Frühstadien noch im Verlauf oder für das Monitoring von Therapie, zu verbessern.

30

### Das Wesen der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, chronisch entzündliche Gelenkerkrankungen besser erkennbar und behandelbar zu machen. Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der nachfolgend beschriebenen "Werkzeuge zur Diagnostik, molekularen Definition und Therapieentwicklung bei

chronisch-entzündlichen Gelenkerkrankungen" und anderen entzündlichen, infektiösen oder tumorösen Erkrankungen gelöst.

High-Throughput Verfahren wie DNA-Array- oder Protein-Array-Technologie ermöglichen die gleichzeitige Bestimmung einer großen Anzahl verschiedener Parameter (9). Es können Gen-Expressionen bestimmt werden auf mRNA-Ebene mittels DNA-Arrays durch Hybridisierung von markierten RNA oder cDNA-Proben und auf Protein-Ebene mittels Arrays von ausgewählten Protein-spezifischen Antikörpern (10). Ferner können Immunreaktivitäten mittels Arrays von ausgewählten Antigenen erfasst werden (11).

Zunächst ist erforderlich, die Gene und Proteine zu definieren, die für die Erkrankung relevant sind und zur Beurteilung herangezogen werden.

Die erfindungsgemäßen Werkzeuge zur Diagnostik und Therapie-Entwicklung bei entzündlichen Gelenkerkrankungen beruhen auf der Verwendung einer solchen definierten Auswahl von Parametern (Tabelle 1 und 2). Unter Verwendung dieser hier genannten Gene zur Genexpressionsanalytik im Array-Verfahren wird eine grundsätzlich neue Diagnostik ermöglicht.

Für DNA-Arrays zur Bestimmung spezifischer mRNA-Expressionsmuster bei Arthritiden können die in Tabelle 1 benannten Gene in ihrer Gesamtheit verwendet werden, sowie solche Gene in ihrer Gesamtheit, die für die Proteine, die in Tabelle 2 benannt sind, kodieren; darüber hinaus sind auch Gene oder Teilsequenzen einzelner oder einer Auswahl der in Tabelle 1 genannten Gene nutzbar, oder Teilsequenzen sowie Gene oder Teilsequenzen einzelner oder einer Auswahl der Gene oder Teilsequenzen, die die in Tabelle 2 genannten Proteinen kodieren.

Für die Charakterisierung der Autoimmunreaktivitäten können die in Tabelle 2 benannten Proteine in ihrer Gesamtheit verwendet werden, sowie solche Proteine, die von den in Tabelle 1 benannten Genen kodiert werden. Ferner können auch eine reduzierte Auswahl dieser Proteine, ausgewählte Teile der Proteine in Form von Oligo- oder Polypeptiden oder auch Modifikationen derselben zum Einsatz kommen. Auf Protein-Ebene sind insbesondere auch posttranslationale Modifikationen (z.B. Glykosylierung, Phosphorylierung etc.) zu berücksichtigen, die für eine Diskriminierung zwischen rheumatischen Erkrankungen relevant sein können. Die Proteine, Protein-Teilsequenzen sowie modifizierte Proteine und Protein-Teilsequenzen werden zusammen oder einzeln oder in Gruppen auf eine Trägermatrix aufgebracht, die geeignet ist, Patienten-Antikörper auf ihre Reaktivität gegenüber einer oder mehrerer dieser Komponenten zu bestimmen. In der Folge ergibt sich für einen Patienten ein Profil von Reaktivitäten und Nicht-Reaktivitäten. Der gravierende Unterschied zwischen der Diagnostik nach dem Stand der Technik und der hier dargestellten ist die Ermittlung und Analyse jeweils einzelner Autoreaktivitäten bei dem Stand der Technik und der Ermittlung und Analyse einer Vielzahl von Autoreaktivitäten nach der Erfindung. Die Erfindung macht sich die unerwartete Entdeckung zu Nutze, dass die Zusammenfassung mehrerer - für sich genommen ungeeigneter Autoreaktivitäten - zu einem oder mehreren Profilen, die beispielsweise eine RA in 100% der Fälle

von einer Nicht-RA (also anderen rheumatischen und nicht-rheumatischen Erkrankungen wie auch von dem gesunden Zustand) diskriminieren können. Die Zuordnung zu diskriminatorisch wirksamen Profilen erfolgt über einen geeigneten Algorithmus, optimal über einen selbst-lernenden, der in der Lage ist, auch zu einem späteren Zeitpunkt gewonnene Erkenntnisse einfließen zu lassen.

- 5 Für die Bestimmung von Proteinexpressionsmustern wurden Array-Systeme entwickelt aus proteinspezifischen Antikörpern. Durch Markierung der Proteine aus einem Proteinextrakt einer Probe können diese quantitativ nach spezifischer Bindung an ihren Antikörper auf dem Array nachgewiesen werden (10). Dementsprechend wird als molekulares Werkzeug im Sinne der Erfindung ein Array definiert, der aus verschiedenen Antikörpern oder Molekülen mit vergleichbarem proteinspezifischen Bindungsverhalten besteht, die zum Nachweis aller oder einer Auswahl der von den Genen der
- 10 Tabelle 1 abgeleiteten Proteine oder aller bzw. einer Auswahl der Proteine der Tabelle 2 dienen können.

- Für die Diagnostik werden Biopsien aus dem Synovialgewebe, Synovialflüssigkeit, Blutzellen und auch Serum bzw. Plasma für die unterschiedlichen Array-Untersuchungen verwendet. Dabei können
- 15 die humoralen Autoreaktivitäten in den flüssigen Proben, die zellulären mit Blut- oder Synovialgewebszellen untersucht werden. Die Proteinexpression lässt sich in allen genannten Proben untersuchen, die Genexpression auf mRNA-Ebene im Synovialgewebe, in Zellen in der Synovialflüssigkeit oder in Blutzellen.

- Für die Untersuchung mittels DNA-Arrays wird aus dem Gewebe oder den Zellproben aus Blut bzw. Synovialflüssigkeit die RNA extrahiert. Unter Verwendung etablierter Protokolle für die
- 20 Amplifikation (12) und die Markierung der abgeleiteten cDNA bzw. cRNA (13) wird eine Probe für eine DNA-Array-Hybridisierung hergestellt.

- Die in der Tabelle genannten Gene liefern mit ihrer bekannten Sequenz (siehe Accession-Nummer GeneBank – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) die Vorlage, um für jedes Gen spezifische Sonden abzuleiten. Diese Sonden werden in einem Array zusammengestellt, entweder durch Auftragen der
- 25 fertigen Sonden über spezifische Druckverfahren (14) oder durch ortsspezifische Synthese wie bei der Photolithographie auf eine Festphase (15, 16).

- Die Hybridisierung der markierten Probe auf dem Array liefert über die orts- und genspezifische Bindung quantitative Signale, die in ein Expressionsprofil /-muster übersetzt werden können. Die
- 30 Muster werden mit verschiedenen etablierten Methoden der Beurteilung korreliert, einschließlich der histologischen Merkmale und der Klassifikation. Durch zusätzlichen Vergleich mit verschiedenen Gelenkerkrankungen wie der Osteoarthritis, der Psoriasisarthritis, reaktiven Arthritiden oder anderen z.B. auch undifferenzierten Arthritiden erlaubt dies eine Einteilung der Patienten in verschiedene Gruppen gemäß dem jeweils entsprechenden Expressionsprofil.



### *Neuartigkeit des Ansatzes*

Um zuverlässige Parameter für die Array-Untersuchung zu definieren, die eine Gruppierung und Beurteilung der Gelenkerkrankungen zulassen, wurden umfangreiche Vergleichsuntersuchungen durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Gelenkerkrankungen herangezogen und eine bislang

5 erstmalig verwendete Kombination von verschiedenen, sich zum Teil ergänzenden Methoden gewählt. So wurde Synovialgewebe von RA, Osteoarthritis und normalen Gelenken untersucht. Zur differentiellen Genexpressionsanalyse wurde zunächst die "representational difference analysis" (17, 18) durchgeführt. Sie besitzt den Vorteil, dass alle in der Probe vorhandenen mRNAs berücksichtigt werden, auch dann, wenn ihre Sequenz bislang noch unbekannt ist. Der Nachteil besteht in einer

10 starken Selektion der ausgeprägtesten Expressionsunterschiede. Ergänzend dazu wurde deshalb zusätzlich die Genexpression mittels zwei verschiedener Methoden der DNA-Array-Hybridisierung durchgeführt, zum einen auf cDNA Filter-Arrays (19), zum anderen auf Oligonucleotid Mikro-Arrays (U.S. Patente Nr. 5,445,934; 5,744,305; 5,700,637 und 5,945,334 sowie EP 619321 und 373203). Diese ermöglichen es nach dem heutigen Kenntnisstand, weitgehend alle bekannten humanen Gene zu

15 berücksichtigen und für jedes dieser Gene individuell die Expression vergleichend zwischen den Gewebeproben darzustellen. Schließlich wurde mittels semiquantitativer Polymerasekettenreaktion (PCR) (real-time PCR) die differentielle Genexpression für ausgewählte Gene an einem größeren Probenkollektiv verifiziert.

Außerdem wurden Gewebe histologisch charakterisiert und entsprechend der histologischen

20 Einteilung auch mit dem zugehörigen differentiellen Genexpressionsmuster verglichen. Es wurden die in der Tabelle 1 aufgeführten Gene als differentiell exprimierte Gene sowohl zwischen den verschiedenen chronischen Gelenkerkrankungen und auch gegenüber normalem Synovialgewebe identifiziert. Damit sind diese Gene bedeutsam für die Charakterisierung der chronischen Gelenkerkrankungen.

25 Es besteht somit auch eine Neuartigkeit im gewählten Ansatz, die relevanten Gene zu identifizieren. Zum anderen zeigte die Liste der gefundenen Gene, dass die meisten bislang noch nicht mit entzündlich-rheumatischen Gelenkerkrankungen in Verbindung gebracht wurden und ebenfalls neuartige Bewertungskriterien für die Diagnostik, die Erforschung der Pathophysiologie und die Behandlung der chronischen Gelenkerkrankungen liefern.

30 Die Merkmale der Erfindung gehen aus den Elementen der Ansprüche und aus der Beschreibung hervor, wobei sowohl einzelne Merkmale als auch mehrere in Form von Kombinationen vorteilhafte Ausführungen darstellen, für die mit dieser Schrift Schutz beantragt wird. Diese Merkmale setzen sich aus bekannten Elementen – den in Tabelle 1 benannten Genen oder Teilsequenzen sowie solchen Genen oder Teilsequenzen, die für die Proteine, die in Tabelle 2 benannt sind, kodieren – und neuen

35 Elementen – den neuen Werkzeugen, die auf der Verwendung einer definierten Auswahl von Parametern (Tabelle 1 und 2) beruhen – zusammen, die in ihrer Kombination zu den

erfindungsgemäßen Werkzeugen führen und unter Verwendung der genannten Gene zur Genexpressionsanalytik im Array-Verfahren eine grundsätzlich neue Diagnostik und Therapie-Entwicklung bei entzündlichen Gelenkerkrankungen ermöglichen.

- 5 Die erfindungsgemäßen Werkzeuge beruhen auf der Verwendung eines High-Throughput Verfahres der (Micro-) Array-Hybridisierung und / oder eines High-Throughput Verfahrens mit Techniken der Polymerase-Ketten-Reaktion zur (Semi-) Quantifizierung.

- 10 Sie sind des weiteren dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung einer markierten Patientenprobe und einer zweiten unterschiedlich markierten Kontrollprobe zur vergleichenden Doppel-Hybridisierung an einen (Micro-) Array zusammen mit der Patientenprobe (rot/grün Vergleichs-Hybridisierung) beruhen. Es können die Proben auch auf getrennten Arrays untersucht werden und danach miteinander verglichen werden.

Erfindungsgemäß handelt es sich um Werkzeuge für diagnostische Zwecke, die auf der Verwendung

- einzelner, einer Auswahl oder aller aus den Gensequenzen in Anspruch 1 bis 3 abgeleiteten Proteine bzw. Peptide

- 15 - einzelner Proteine, einer Auswahl von Proteinen oder aller Proteine, die in der Tabelle 2 genannt sind sowie
- von Teilsequenzen einzelner Proteine, einer Auswahl von Proteinen oder aller Proteine, die in der Tabelle 1 genannt sind
- beruhen.

- 20 Sie beziehen Proteine oder Protein-Teilsequenzen ein, die in ihrer Sequenz identisch zu den in der Tabelle 1 abgeleiteten Proteinen oder den in der Tabelle 2 genannten Proteinen sind oder mindestens 80% Sequenzidentität besitzen. Des weiteren sind sie dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung von

- 25 - High-Throughput Verfahren in der Protein-Expressionsanalytik (hochauflösende, zweidimensionale Protein-Gelelektrophorese, MALDI-Techniken)
- High-Throughput Verfahren in der Protein-Spotting Technik (Protein Arrays) zum Screening von Autoantikörpern als diagnostisches Werkzeug für entzündliche Gelenkerkrankungen und andere entzündliche, infektiöse oder tumoröse Erkrankungen beim Menschen
  - High-Throughput Verfahren in der Protein-Spotting Technik (Protein Arrays) zum Screening von
- 30 autoreaktiven T-Zellen als diagnostisches Werkzeug für entzündliche Gelenkerkrankungen und andere entzündliche, infektiöse oder tumoröse Erkrankungen beim Menschen sowie
- Nicht-High-Throughput Verfahren in der Protein-Spotting Technik zum Screening von autoreaktiven T-Zellen als diagnostisches Werkzeug für entzündliche Gelenkerkrankungen und andere entzündliche, infektiöse oder tumoröse Erkrankungen beim Menschen

beruhen.

Ferner beruhen die erfindungsgemäßen Werkzeuge auf der Verwendung

- von Antikörpern, die spezifisch für Proteine oder Teilsequenzen sind, die unter den Ansprüchen 6 bis 9 aufgeführt sind sowie

- 5 - der entsprechenden homologen Sequenzen einer anderen Spezies zur Analytik in Tierexperimenten oder zur Diagnostik bei Tieren mit entzündlichen Gelenkerkrankungen und anderen entzündlichen, infektiösen oder tumorösen Erkrankungen.

Die erfindungsgemäßen Werkzeuge eignen sich als diagnostische Werkzeuge zum Nachweis genetischer Veränderungen (Mutationen)

- 10 - in den unter Anspruch 1 bis 3 genannten Genen oder deren Regulationssequenzen (Promotor, Enhancer, Silencer, spezifische Sequenzen für die Bindung weiterer regulatorischer Faktoren) sowie
- in den Genen oder deren Regulationssequenzen (Promotor, Enhancer, Silencer, spezifische Sequenzen für die Bindung weiterer regulatorischer Faktoren), die für die in der Tabelle 2 genannten Proteine codieren.

- 15 Ferner eignen sie sich als Werkzeuge zur molekularen Definition entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser Erkrankungen beim Menschen unter Verwendung der in Anspruch 1 bis 3 benannten Gene, DNA-Sequenzen oder davon abgeleitete Proteine oder Peptide sowie der Proteine und Protein-Teilsequenzen aus Anspruch 6 bis 9 oder den dafür codierenden Gensequenzen.

- 20 Die erfindungsgemäßen Werkzeuge werden des weiteren eingesetzt

- zum Therapie-Entscheid entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser Erkrankungen beim Menschen unter Verwendung der in Anspruch 1 bis 3 benannten Gene, DNA-Sequenzen oder davon abgeleitete Proteine oder Peptide

- 25 - zur Verlaufskontrolle/Therapiekontrolle entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser Erkrankungen beim Menschen unter Verwendung der in Anspruch 1 bis 3 benannten Gene, DNA-Sequenzen oder davon abgeleitete Proteine oder Peptide

- als molekulare Werkzeuge zur Entwicklung von Therapiekonzepten, die die direkte oder indirekte Beeinflussung der Expression der in Anspruch 1 bis 3 benannten Gene oder Gensequenzen beinhalten

- 30 - zur Entwicklung von Therapiekonzepten, die die direkte oder indirekte Beeinflussung der Expression der in Anspruch 6 bis 9 benannten Proteine oder Protein-Teilsequenzen zum Inhalt haben

- zur Entwicklung von Therapiekonzepten, die die direkte oder indirekte Beeinflussung autoreaktiver T-Zellen, gerichtet gegen die in Anspruch 8 bis 11 benannten Proteine oder Protein-Teilsequenzen, beinhalten

- zur Beeinflussung der biologischen Wirkung der aus den in Anspruch 1 bis 3 benannten Gensequenzen abgeleiteten Proteine
  - zur Beeinflussung der unmittelbaren molekularen Regelkreise, in die die in Anspruch 1 bis 3 benannten Gene und davon abgeleiteten Proteine eingebunden sind
- 5 - zur Entwicklung von Therapiekonzepten unter Design und Verwendung von Interpretationsalgorithmen, die die genannten Gene und Sequenzen und deren Regulationsmechanismen verwenden, um Therapiekonzepte, -wirkungen, -optimierungen oder Krankheitsprognosen erkennen zu lassen oder voraussagen sowie
- 10 - zur Entwicklung von biologisch wirksamen Medikamenten (Biologicals) unter Verwendung von Genen, Gensequenzen, Regulation von Genen oder Gensequenzen, oder unter Verwendung von Proteinen, Proteinsequenzen, Fusionsproteinen nach Ansprüchen 1 bis 3 und 6 bis 9 oder unter Verwendung von Antikörpern oder autoreaktiven T-Zellen nach den Ansprüchen 10 bis 14.
- Die erfindungsgemäße Verwendung der beanspruchten Werkzeuge liegt in der
- Untersuchung von Blutproben oder Gewebeproben in der medizinischen Diagnostik
- 15 - Anwendung in der Analytik nach Beispiel 1 sowie in der
- Anwendung für Therapiekonzepte nach Beispiel 2.

## ***Material und Methoden***

### ***Patienten und Gewebeasservierung***

- 20 Alle Patienten wurden nach den ACR-Kriterien für RA (1) und OA (20) ausgewählt. Synovialgewebe wurde in RPMI-Medium (RPMI – handelsübliches Zellkulturmedium, Verdünnungsmedium RPMI 1640; Moore, G. E. et al., J. Am. Assoc. 199, 519 - 524, 1967), unter Zusatz von Penicillin und Streptomycin (je 100U/ml), vom Operationssaal direkt ins Labor gebracht. Nach Präparation der Synovialmembran wurden die Proben sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der
- 25 Proben bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei -80°C. Es wurden für die Representational Difference Analysis (RDA), die Hybridisierungen auf Unigene Filter-Arrays (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>) und die Hybridisierung auf Affymetrix Arrays Normalspender (ND), Osteoarthritis (OA) und rheumatoide Arthritis Synovialgewebeproben verwendet.

### ***RNA-Isolation***

Zur RNA-Gewinnung wurden die Proben homogenisiert: Gewebemengen <50mg wurden mit Mörser und Pistill unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff zu Pulver zerrieben und anschließend in

Guanidinium-Isothiocyanat enthaltender Lösung (RLT-Puffer der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland – [www.qiagen.com/literature/handbooks/rna/my96/1019545\\_PREHB\\_RNY96\\_prot2.pdf](http://www.qiagen.com/literature/handbooks/rna/my96/1019545_PREHB_RNY96_prot2.pdf)) lysiert.

Größere Gewebemengen wurden mit einem Gewebe-Homogenisator; IKA-Ultra-Turrax T 25 (Jahnke & Kunkel, Staufen) in eiskalter Guanidinium-Isothiocyanat enthaltender Lösung (RLT-Puffer der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland) zerkleinert. Die RNA-Isolierung erfolgte mit einem modifizierten Protokoll, das die Phenol-Chloroform-Extraktion nach Chomczynski (21) nutzt und anschließend aus der wässrigen Phase sofort die RNA mittels QIAGEN-RNasy-Kit (Handbuch des Herstellers <http://www.qiagen.com/literature/rnalit.asp#mini>) extrahiert. Der Kit wurde gemäß Herstellerprotokoll eingesetzt. Die RNA wurde in 30–100 µl RNase-freies Wasser eluiert.

- 10 Zur Qualitätskontrolle wurde die optische Dichte (OD) bei 260 nm (OD<sub>260</sub>) gemessen, das Verhältnis OD<sub>260</sub>/OD<sub>280nm</sub> bestimmt und eine Gelelektrophorese in 1%-iger Agarose durchgeführt. DNA-Kontaminationen konnten gegebenenfalls entweder im Gel detektiert oder nach Erststrangsynthese in einer PCR mit einem Intron-Primer für Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) nachgewiesen werden. In diesen Ausnahmefällen wurde zusätzlich mit DNase verdaut, entsprechend dem Protokoll von QIAGEN.

#### *Erststrangsynthese*

Für die cDNA-Synthese wurde Superscript II Reverse Transcriptase (RT), einschließlich des 5-fach-Reaktionspuffers von Invitrogen/Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland <http://www.invitrogen.com>) verwendet. Die eingesetzten RNA-Mengen betrugen 3–5 µg für die semiquantitative PCR sowie 10–20 µg für die RDA und die Array-Hybridisierungen in einem Endvolumen von 20 µl. Der Reaktionsansatz für die Umschreibung in cDNA enthielt folgende Komponenten: 500 ng des jeweiligen Oligonukleotids (Oligo(dT)<sub>12-18</sub>; T7-Oligo (dT<sub>24</sub>)) als Primer; 50 mM Tris, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Dithiothreitol, deoxy-Nukleotid-Triphosphat (dNTP) Mischung mit jedem Nukleotid in 1 mM Endkonzentration, 40 U RNase-Inhibitor und 20 U Superscript™ II RT. Die Inkubationsdauer betrug 1 Stunde und 30 min., und im Anschluss daran erfolgte die Inaktivierung der Enzyme durch 15 min. Erhitzen auf 72°C.

#### *Zweitstrangsynthese*

Zur cDNA wurden 90 µl Aqua dest. pipettiert, 30 µl 5fach-Zweitstrangpuffer folgender Zusammensetzung: 500 mM KCl, 50 mM Ammoniumacetat, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,75 mM beta-Nikotinamid-Adenen Dinukleotid (β-NAD) und 0,25 mg/ml bovinem Serumalbumin (BSA) sowie 3 µl einer 10 mM dNTP-Lösung und Enzymlösung folgender Aktivitäten und Mengen: 1 µl E.coli Ligase (10 U/µl), 4 µl DNA Polymerase I (10 U/µl) und 1 µl RNaseH (2 U/µl) (Invitrogen/Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland). Die Inkubation betrug 2 Stunden bei einer Temperatur von 16°C. Nach Zusatz von 2 µl einer T4-DNA-Polymerase (5 U/µl) wurde für weitere 30 min. bei 16°C inkubiert.

### *Subtraktive Hybridisierung und RDA*

Die PCR Suppression Subtractive Hybridization (SSH) (22) wurde nach der Arbeitsvorschrift des Herstellers des PCR Select Kits (Clontech, Palo Alto, USA <http://www.clontech.com/pcr-select/index.shtml>) durchgeführt. Der Verdau der doppelsträngigen cDNA erfolgte mit dem

5 Restriktionsenzym RsaI von *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Für die RDA (18) wurde die doppelsträngige cDNA mit dem Restriktionsenzym DPNII –von *Diplococcus pneumoniae* (20U in 100µl) geschnitten. Anschließend wurde an Adapterprimer (RBgl12, RBgl24) ligiert und amplifiziert gemäß publizierten Protokollen (17, 18). Das Tester-Amplikon wurde nach erneutem Restriktionsverdau mit DPNII durch Ligation an ein weiteres Adapter-Oligonukleotid erhalten (JBgl12 und JBgl24 bzw. NBgl 12 und NBgl24(18)) in der zweiten Subtraktionsrunde).

Nach der Hybridisierung wurden bei beiden Methoden die sich vom Tester ableitenden Sequenzen selektiv über PCR amplifiziert und dadurch im Subtraktionsprodukt angereichert.

### *Beschreibung der Subtraktionsansätze*

15 Die RDA-Protokolle wurden so variiert, dass es möglich war, sowohl geringer wie auch verstärkt exprimierte Gene in den Proben von RA, OA und Normalspendergeweben zu identifizieren.

Dabei wurde:

- 1 OA (Driver) subtrahiert von RA (Tester), um Sequenzen zu erhalten, die stärker in RA als in OA-Geweben exprimiert sind
- 2 RA (Driver) subtrahiert von ND (Tester), um Sequenzen zu erhalten, die in RA geringer  
20 exprimiert sind als in ND-Proben
- 3 ND (Driver) subtrahiert von OA (Tester), um Sequenzen zu erhalten, die stärker in OA als in ND-Geweben exprimiert sind

### *Herstellung der Subtraktionsbanken- Klonierung, Sequenzierung und Datenbankvergleiche*

25 Die Subtraktionsprodukte des SSH-Ansatzes wurden in einen pCRII vector (TA-Cloning Kit; Invitrogen, Heidelberg, Germany <http://www.invitrogen.com>) kloniert. Die Subtraktionsprodukte aus der RDA wurden in einen pBluescript KS<sup>+</sup>II vector (Stratagene, La Jolla, USA <http://www.stratagene.com/vectors/selection/plasmid1.htm>) kloniert, der zuvor mit dem Restriktionsenzym BamHI von *Bacillus amyloliquefaciens* geschnitten und anschließend dephosphoryliert und gereinigt wurde. Etwa 150 Klone wurden isoliert und sequenziert unter  
30 Verwendung eines ABI 377 Sequenzier-Gerätes (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany <http://home.appliedbiosystems.com>). Sequenziert wurde nach dem Dye Terminator Chemistry Protokoll des Herstellers unter Verwendung eines T7-Primers.

Die Sequenzvergleiche erfolgten nach Eliminierung der Vektorsequenzen unter Nutzung der Genebank und NCBI-Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### *Microarray-Hybridisierung*

Es wurden zwei verschiedene Chiptechnologien eingesetzt: 1.) Es wurden Filter benutzt, auf denen PCR-Produkte von cDNA-Klonen der UNIGENE Bibliothek (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>) gespottet waren. Die Hybridisierung erfolgte dabei bei 65°C

5 mit <sup>33</sup>P-markierten cDNA-Proben nach Erststrangsynthese mit Oligo(dT<sub>(12-18)</sub>)(23, 24). 2.) Es erfolgten mit MicroArrays (HU95A; HU95B, HU95C, HU95D und HU95E) der Firma Affymetrix (Affymetrix Inc., Santa Clara, USA [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)) Hybridisierungen, bei denen es sich um Oligonucleotid-Arrays handelt, deren Basenfolge sich von 12.000 bekannten Genen und 24.000 Expressed Sequence Tag (EST-) Einträgen ableitet. Die Synthese der markierten Proben erfolgte entsprechend dem

10 technischen Manual des Herstellers (Affymetrix Inc., Santa Clara, USA).

Die fluoreszenz-markierte Probe wird synthetisiert nach Umschreibung mit einem Oligo-dT<sub>24</sub>-Primer, der eine T7-Polymerase-Bindungsstelle besitzt. Die Markierungsreaktion erfolgte mit T7-RNA-Polymerase und biotinylierten dNTPs entsprechend dem Hersteller-Protokoll (ENZO-Biochem, New York, USA, <http://www.enzo.com/entrance.html>).

15 In beiden Chip-Analysen wurden die zu testende Probe und die Referenzprobe auf separaten Filtern hybridisiert. Der Vergleich der Signal-Intensitäten erfolgte nach Normalisierung.

### *Auswertung der Chipergebnisse- Entscheidungsmatrix*

Auswertung der Signal-Intensitäten erfolgte mit der für den entsprechenden Array entwickelten Software nach Normalisierung und Ermitteln eines Intensitätswertes für die entsprechende Probe gemäß der Tukey's Biweight Methode (<http://mathworld.wolfram.com/TukeysBiweight.html>).

20

Für die Auswertung der Unigene-Filterarrays wurde der Algorithmus am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin-Dahlem entwickelt (<http://algorithmics.molgen.mpg.de/>), für die Chips der Firma Affymetrix wurde die MicroArraySuite 5.0 Software (<http://www.affymetrix.com/products/software/specific/mas.affx>) einschließlich der

25 Standardeinstellungen bzw. Vorgaben des Herstellers eingesetzt.

Für die Auswertung der Affymetrix-Arrays wurde für die Normalisierung der Daten die Target Intensität auf 100 und der Normalisierungsfaktor auf 1 gesetzt und der Skalierungsfaktor für jede Probe errechnet. Chips mit vergleichbaren Skalierungsfaktoren (Faktor < 4) wurden in die Vergleichsanalysen einbezogen. Entscheidungskriterium für den Nachweis eines Genes (Detection p Value) wurde auf < 0.05 eingestellt. Unter Nutzung der DMT 3.0 Software (<http://www.affymetrix.com/products/software/specific/dmt.affx>) von Affymetrix wurden die Vergleichsanalysen für die entsprechenden Arrays durchgeführt.

30

Dabei werden im Wilcoxon-Test (<http://faculty.vassar.edu/lowry/wilcoxon.html>) die Differenzen zwischen den Perfekt Matches und den Perfekt- und Mismatch-Intensitäten berechnet und mit dem

35 Entscheidungskriterium Cut-Off ( $\gamma$ -Wert < 0.04) verglichen. In der Ausgabe der Ergebnisse für den

Vergleich der jeweiligen Chips wird ein Change- Call (erhöht, marginal erhöht, keine Änderung oder erniedrigt) sowie das Signal Log Ratio, ein Maß für den Faktor der Änderung angegeben (logarithmierter Faktor).

#### *Entscheidungskriterium:*

- 5 Es wurden jeweils für alle Proben die Vergleichsanalysen (jede Probe gegen jede der anderen Gruppe: ND, OA, RA) durchgeführt.

Für die Unigene-Filterhybridisierungen wurde ein Signalunterschied  $>2$  für mindestens 3 von 4 Vergleichen und ein Detektionssignal mit einem p-Wert  $<0,01$  berücksichtigt.

- 10 Für die Arrays der Firma Affymetrix wurde wie folgt verfahren: Jede RA-Probe wurde mit jeder der OA-Proben sowohl in Richtung erhöhter, wie auch erniedigter Expression verglichen. Gene, die in 80% dieser Vergleiche eine Auslenkung im Sinne „erhöht“ bzw. „erniedigt“ anzeigten bei einem Regulationsfaktor  $>2$  (Signal Log Ratio  $>1$ ), wurden als Kandidatengene ausgewählt. Im U95A Chip wurde das Auswahlkriterium auf einen Regulationsfaktor  $>3$  gesetzt.

#### *Semiquantitative PCR*

- 15 Aus den detektierten Sequenzbereichen wurden Primer ausgewählt, die eine vergleichbare Annealingtemperatur und Produktlänge aufwiesen. Zur Primersuche wurde die DNASTAR Primer Select Software (DNASTAR Inc., Madison, USA <http://www.dnastar.com/>) verwendet. Die Primersynthese erfolgte bei Gibco-Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland). Für die Semiquantifizierung der PCR-Produkte wurde das real time PCR-System GeneAmp 5700 und der
- 20 Sybr-Green-PCR-Core Kit (Applied Biosystem, Weiterstedt, Germany; <http://europe.appliedbiosystems.com/>) eingesetzt.

- Die cDNA-Mengen wurden für alle Proben anhand der real-time-Amplifikationsergebnisse für GAPDH-spezifische Primer aufeinander abgestimmt. Die Quantifizierung der PCR-Produkte verschiedener weiterer Gene erfolgte in Relation zum GAPDH-spezifischen Produkt als internem
- 25 Standard. Zur Kontrolle wurde für alle Proben  $\beta$ -Actin amplifiziert und als zweites Haushaltsgen mitbestimmt.

Genbezeichnung	AccNr	Primer-Lokalisation	Produktlänge (bp)
VDUP1	NM006472	665...684 / 863...840	199
TIMP4	U76456	143...159 / 336...317	194
GPX3	NM002084	424...443 / 528...510	105
$\beta$ Actin	X00351-	654...675 / 841...819	188
MMP1	X05231	874...895 / 1080...1057	207
MMP3	X05232	973...996 / 1157...1136	185



LTBP4	M22490	511...534 / 760...737	250
GADD45	M60974	457...475 / 573...557	116
CLU	NM001831	1384...1404 / 1509...1489	126
Ca12	NM001218	930...949 / 1 049...1031	196

### *Immunhistochemie*

Eine Probe der Synovialmembran wurde für die histopathologische Beurteilung verwendet. Dazu wurden Kryoschnitte in einer Dicke von 6 µm angefertigt, luftgetrocknet und anschließend in einem 1:1 Gemisch aus Aceton und Methanol fixiert. Die Hämatoxilin-färbung wurde nach Standardprotokollen durchgeführt und nach histopathologischen Beurteilungskriterien unterteilt (25).

### *Methoden und Ergebnisse zur Immunom-Analyse*

Um Autoreaktivitätsmuster auf dem T- und B-Zell-Level zu bestimmen (das Immunom), die spezifisch für die RA sind und die somit die Erkrankung von anderen rheumatischen und nicht-rheumatischen Erkrankungen diskriminieren. Die Kenntnis des RA-spezifischen Immunoms ist von herausragender Bedeutung, um diagnostische Werkzeuge zu entwickeln, die eine Arthritis sehr viel früher und sicherer als eine RA diagnostizieren bzw. als eine RA ausschließen als bislang möglich. Dieses wiederum erlaubt es, die RA medikamentös unter Kontrolle zu halten, bevor irreversible Gelenk- und Knochenschädigungen eingetreten sind.

Dazu wurden die Techniken der Proteomics eingesetzt, um durch hochauflösende 2D-Gelelektrophorese gewebespezifische Protein-Muster zu erzeugen. Diese wurden durch Techniken der Immunomics nach bekannten und unbekannten Autoreaktivitäten gescreent. Proteinspots mit einer nutzbaren Sensitivität und Spezifität werden durch Sequenzierung und MALDI-TOF (26) identifiziert. Diese Proteine werden anschließend auf T-Zell-Autoreaktivität in derselben Kohorte gescreent.

Erfindungsgemäß sind Autoreaktivitätsmuster etabliert worden, die absolut RA-spezifisch sind. Bei dieser Analyse ist von großer Bedeutung, dass keine einzelne Autoreaktivität diese Spezifität erzielt hat. Dies wird erst durch die Kombination mehrerer Autoreaktivitäten erreicht. Solche Muster, die einen Patienten mit RA eindeutig unterscheiden von einem mit einer anderen rheumatischen oder nicht-rheumatischen Erkrankung, umfassen die Autoantigene citrullinierte Peptide (Cit), IgG, BiP (Heavy Chain Binding Protein), Calpastatin (Calp), RA33 (hnRNP A2) und Calreticulin (Calr). Die Tabelle zeigt alle möglichen Kombinationen von fünf dieser Autoreaktivitäten (RF, Cit, BiP, RA33 und Calp) sowie die beiden möglichen Zustände "positiv" und "negativ". Die hervorgehobenen Muster sind (statistisch signifikant,  $p < 0.01$ , Whitney U Test, <http://faculty.vassar.edu/lowry/utest.html>) ausschließlich bei der RA exprimiert. Fig. 1 zeigt die Sensitivitäten aller möglicher Kombinationen für die RA sowie die Kontroll-Kohorten. Die RA-spezifischen Muster sind analog zu Tabelle 1 hervorgehoben und umfassen im wesentlichen diejenigen, die 4- und 5-fach positiv für die

Einzelparameter sind. Die Kombination derjenigen Autoreaktivitätsprofile, die ausschließlich bei der RA auftreten, ergibt eine Sensitivität von 54%.

RA-exklusiv exprimierte Muster der drei Autoreaktivitäten, gerichtet gegen IgG, Cit und BiP (RF+Cit+BiP+ and RF-Cit+BiP+) ergeben eine Gesamtsensitivität von 43%. RA-exklusive Muster der vier Autoreaktivitäten, gerichtet gegen IgG, Cit, BiP und RA33 (RF+Cit+BiP+RA33+, RF+Cit+BiP-RA33+ and RF+Cit+BiP+RA33-) weisen eine Gesamtsensitivität von 40% auf. Bei der Analyse von sechs Mustern wird eine Sensitivität von 60% erzielt.

Ersten Untersuchungen zufolge sind diese Muster auch bei Patienten mit früher RA relevant. Weitere Kandidaten-Antigene, die bereits charakterisiert sind, umfassen das Sa-Antigen(5), das vermutlich aus  $\alpha$ -Enolase und citrulliniertem Vimentin besteht.

Die Identifikation des Immunoms der RA ist nicht nur von diagnostischer, sondern auch von pathogenetischer Relevanz. Wenn diejenigen T-zellulären Autoreaktivitäten, die die frühe RA treiben, identifiziert sind, erscheint es möglich, spezifisch wirksame Therapie-Protokolle zu entwickeln.

	RF	Citrullin	BiP	Calpastatin	RA33
2					
3					
4					
5	+		+	+	+
6	+				
7	+	-	-	+	+
8	-	-	+	+	+
9	+	-	+	+	-
10	-	+	+	+	-
11	+	+	-	+	-
12	-	+	-	+	+
13	+	+	+	-	-
14	+	+	-	-	+
15	-	+	+	-	+
16	+	-	+	-	+
17		-	+	+	-
18				+	+
19		+	-	+	
20	+	-		+	
21	+				+
22					
23					
24		+	+		
25	+				
26					+
27	-	-	-	+	-

	RF	Citrullin	BiP	Calpastatin	RA33
28	-	-	+	-	-
29	-	-	-	-	+
30	-	+	-	-	-
31	+	-	-	-	-
32					

**Tab. 1 Autoreaktivitätsmuster mit RF, Citrullin, BiP, Calpastatin und RA33**

Dargestellt sind alle 32 möglichen Fünffach-Kombinationen der Autoreaktivitäten gegen IgG (RF), Citrullin, BiP, Calpastatin und RA33. Die RA-spezifischen Kombinationen sind analog

5 Figur 1 farbig unterlegt.

### Nutzen

Es werden komplexe molekulare Muster erfasst. Diese können durch mathematische Berechnungsmodelle in Gruppen und Verwandtschaftsgrade eingeteilt werden. Die daraus ableitbare Einteilung und das Wissen über die Assoziation z.B. mit der Dauer der Erkrankung, der klinischen Krankheitsaktivität (Disease Activity Score (Ref.)), der Entzündungsaktivität gemessen an der Erhöhung des C reaktiven Proteins oder Blutsenkung, der radiologischen Gelenkzerstörung und dem spezifischen Medikamenteneinfluss lassen folgende Rückschlüsse aus der Array-Analyse ziehen: Zuordnung des Krankheitsbildes zu einer definierten Diagnose und zu einer molekular abgrenzbaren Untergruppe, Beurteilung der Krankheitsaktivität und der zu erwartenden Progredienz (Prognoseabschätzung), Erfolgsaussichten der verschiedenen Therapieformen, Empfehlung zum therapeutischen Vorgehen (z.B. Methotrexat statt Leflunomid oder Kombination Sulfasalazin mit Methotrexat statt Methotrexat allein) und schließlich Überwachung des Therapieerfolges.

Durch Einsatz vor und während definierter medikamentöser Behandlungsmaßnahmen kann erfasst werden, welche der verwendeten Gene durch das Medikament beeinflusst werden. Es wird damit gemessen, wie das Medikament die für die Krankheit typischerweise veränderte Genexpression beeinflusst. Daraus lassen sich ablesen, welche krankheitsassoziierten molekularen Veränderungen trotz Therapie immer noch aktiv sind. Aus der Kenntnis über die Funktion dieser pathologisch aktiven Gene lassen sich prinzipiell pathophysiologische Abläufe der Gelenkerkrankungen erschließen und neue Therapiekonzepte ableiten.

*Zusammenstellung der Gene**Tabelle 1:*

Accession Nummer	Unigene Kodierung	Gen Name	Methode	Regulation
X57809	Hs.181125		RDA, Affymetrix	RA>OA
X58141			RDA	RA>OA
X63527	Hs.252723	ribosomal protein L19	RDA	RA>OA
U10362	Hs.75864	chromosome 5 open reading frame 8	RDA	RA>OA
M80244	Hs.184601	NM_003486	RDA	RA>OA
M24594	Hs.20315	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	RDA	OA>RA
U01244	Hs.79732	fibulin 1 isoform C precursor NM_006485	RDA	RA>OA
X02761	Hs.287820	fibronectin 1, isoform 1 preproprotein	RDA	RA>OA, OA>NS
L01124	Hs.165590	ribosomal protein S13	RDA	NS>RA
M65062	Hs.107169	insulin-like growth factor binding protein 5	RDA	
M15330	Hs.126256	interleukin 1, beta		
L13210	Hs.79339	galectin 3 binding protein	RDA	
X05232	Hs.83326	matrix metalloproteinase 3 preproprotein		RA>NS, OA
M22490	Hs.68879	bone morphogenetic protein 4	RDA, Affymetrix	NS>RA
AL034397			RDA	OA>NS
M22806			RDA	OA>NS
X06256	Hs.149609	integrin alpha 5 precursor	Unigene	NS>RA
L49169	Hs.75678	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	Unigene	NS>RA
AB002409	Hs.57907	small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 21	Unigene	RA>NS
X03473	Hs.226117	H1 histone family, member 0	RDA	OA>NS
M92843	Hs.343586	zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)	Unigene	NS>RA
M21121	Hs.241392	small inducible cytokine A5 (RANTES)	Affymetrix	RA>OA
U05259			Affymetrix	RA>OA
U80114	Hs.247987		Affymetrix	RA>OA
U81234	Hs.164021	small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 6 (granulocyte chemotac	Affymetrix	RA>OA
D11086	Hs.84	interleukin 2 receptor, gamma chain precursor	Affymetrix	RA>OA

## gamma chain, precursor

X97267			Affymetrix	RA>OA
U23852			Affymetrix	RA>OA
AA522530	Hs.111244	RTP801	Affymetrix	RA>OA
AF037335	Hs.5338	carbonic anhydrase XII precursor	Affymetrix	RA>OA
U97145	Hs.19317	GDNF family receptor alpha 2	Affymetrix	RA>OA
AA919102	Hs.95327	CD3D antigen, delta polypeptide (TiT3 complex)	Affymetrix	RA>OA
M63928	Hs.180841	CD27 antigen	Affymetrix	RA>OA
Z49194	Hs.2407	POU domain, class 2, associating factor 1	Affymetrix	RA>OA
AL031983			Affymetrix	RA>OA
D15050	Hs.232068		Affymetrix	RA>OA
X92997	Hs.342651		Affymetrix	RA>OA
J03910			Affymetrix	RA>OA
J04132	Hs.97087	T-cell receptor zeta chain precursor	Affymetrix	RA>OA
M55153	Hs.8265	transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)	Affymetrix	RA>OA
M12959	Hs.74647		Affymetrix	RA>OA
AF031815	Hs.89230	potassium intermediate	Affymetrix	RA>OA
L31584			Affymetrix	RA>OA
X54489			Affymetrix	RA>OA
AF043129			Affymetrix	RA>OA
X59871	Hs.169294	transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box)	Affymetrix	RA>OA
AI743134	Hs.21858	trinucleotide repeat containing 3	Affymetrix	RA>OA
Y13323	Hs.145296	disintegrin protease	Affymetrix	RA>OA
U77735	Hs.80205	pim-2 oncogene	Affymetrix	RA,OA>NS
U58515	Hs.154138	chitinase 3-like 2	Affymetrix	RA,OA>NS
M17016	Hs.1051	granzyme B precursor	Affymetrix	RA>OA
X03066	Hs.1802	major histocompatibility complex, class II, DO beta	Affymetrix	RA,OA>NS
M28170	Hs.96023	CD19 antigen	Affymetrix	RA,OA>NS
L24564	Hs.1027	Ras-related associated with diabetes	Affymetrix	NS>RA
M68840	Hs.183109	monoamine oxidase A	Affymetrix	NS>RA
U76456	Hs.190787	tissue inhibitor of metalloproteinase 4 precursor	Affymetrix	OA>RA
D13814	Hs.89472	angiotensin receptor 1 NM_004835	Affymetrix	NS>RA
AA420624	Hs.183109	monoamine oxidase A	Affymetrix	OA>RA
X51757	Hs.3268	heat shock 70kD protein 6 (HSP70B')	Affymetrix	NS>RA

U29344 L19871	Hs.83190 Hs.460	fatty acid synthase activating transcription factor 3 long isoform NM_004024	Affymetrix Affymetrix	NS>RA NS>RA
J02611	Hs.75736	apolipoprotein D precursor	Affymetrix	NS>RA
M12272	Hs.2523	class I alcohol dehydrogenase, gamma subunit	Affymetrix	NS>RA
L34041	Hs.348601	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	Affymetrix	NS>RA
L12760	Hs.1872	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)	Affymetrix	OA>RA
M63978 S95936 U42031 Z97171 S69790 U41843	Hs.284176 Hs.7557	transferrin precursor FK506-binding protein 5	Affymetrix Affymetrix Affymetrix Affymetrix Affymetrix Affymetrix	RA>OA NS>RA NS>RA NS>RA NS>RA OA,NS>RA
AL049653 M31682	Hs.1735	DR1-associated protein 1 (negative cofactor 2 alpha)	Affymetrix Affymetrix	NS>RA NS>RA
AF009767 X02910	Hs.132898 Hs.241570	inhibin beta B subunit precursor fatty acid desaturase 1 tumor necrosis factor (cachectin)	Affymetrix Affymetrix	NS>RA,OA NS>RA,OA
AB023152 U37283	Hs.12183 Hs.300946	Microfibril-associated glycoprotein-2	Affymetrix Affymetrix	NS>RA,OA OA,NS>RA
X05451 W26480 D14874 M12174	Hs.158295 Hs.132898 Hs.394 Hs.204354	fatty acid desaturase 1 adrenomedullin ras homolog gene family, member B	Affymetrix Affymetrix Affymetrix Affymetrix	OA,NS>RA NS>RA RA>NS NS>RA
M60974	Hs.80409	growth arrest and DNA- damage-inducible, alpha	Affymetrix	NS>RA
S62138 X16706 X56667	Hs.301612 Hs.106857	FOS-like antigen 2 calbindin 2, full length protein isoform NM_007087	Affymetrix Affymetrix Affymetrix	NS>RA NS>RA NS>RA
H15814 AL021977 U80055 U09564 U14407 U27185	Hs.75761 Hs.168132 Hs.82547	SFRS protein kinase 1 interleukin 15 retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	Affymetrix Affymetrix Affymetrix Affymetrix Affymetrix Affymetrix	NS>RA NS>RA NS>RA RA>OA RA>OA RA>OA
Z35278	Hs.170019	runt-related transcription factor 3	Affymetrix	RA>OA

M12886	Hs.303157		Affymetrix	RA>OA
L05424			Affymetrix	RA>OA
L09230	Hs.301921	chemokine (C-C motif) receptor 1	Affymetrix	RA>OA
L22075	Hs.1666	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 13	Affymetrix	RA>OA
M28130			Affymetrix	RA>OA
M29696	Hs.237868	interleukin 7 receptor	Affymetrix	RA>OA
M31165	Hs.29352	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	Affymetrix	RA>OA
M16038	Hs.80887	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	Affymetrix	RA>OA
X83490			Affymetrix	RA>OA
D13666	Hs.136348	osteoblast specific factor 2 (fasciclin I-like)	Affymetrix	RA>OA
L10717	Hs.211576	IL2-inducible T-cell kinase	Affymetrix	RA>OA
X04500	Hs.126256	interleukin 1, beta	Affymetrix	RA>OA
U24153	Hs.30692	p21 (CDKN1A)-activated kinase 2	Affymetrix	RA>OA
M32315	Hs.256278	tumor necrosis factor receptor 2 (75kD)	Affymetrix	RA>OA
U51903	Hs.78993	IQ motif containing GTPase activating protein 2	Affymetrix	RA>OA
AF002700	Hs.19317	GDNF family receptor alpha 2	Affymetrix	RA>OA
U37518	Hs.83429	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	Affymetrix	RA>OA
HG1103-HT1103			Affymetrix	RA>OA
HG3521-HT3715			Affymetrix	RA>OA
AF024710			Affymetrix	RA>OA
U01134	Hs.138671	fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor	Affymetrix	RA>OA
U27467	Hs.227817	BCL2-related protein A1	Affymetrix	RA>OA
M79321	Hs.80887	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	Affymetrix	RA>OA
J04765	Hs.313	secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T- lymphocyte	Affymetrix	RA>OA
M21154	Hs.262476	S-adenosylmethionine decarboxylase 1 precursor	Affymetrix	RA>OA
AF098641	Hs.306278		Affymetrix	RA>OA
D63789	Hs.174228	small inducible cytokine subfamily C member 2	Affymetrix	RA>OA

## subfamily C, member 2

S68134	Hs.351252	cAMP responsive element modulator	Affymetrix	RA>OA
AB014515	Hs.323712	KIAA0615 gene product	Affymetrix	RA>OA
AI800499	Hs.161002		Affymetrix	RA>OA
Y13710	Hs.16530	small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 18, pulmonary and activat	Affymetrix	RA>OA
AJ011915	Hs.184376	synaptosomal-associated protein, 23kD	Affymetrix	RA>OA
AF030339	Hs.286229	plexin C1	Affymetrix	RA>OA
X17042	Hs.1908	proteoglycan 1, secretory granule	Affymetrix	RA>OA
AF059214	Hs.194687	cholesterol 25-hydroxylase	Affymetrix	RA>OA
D42043	Hs.79123		Affymetrix	RA>OA
M24283	Hs.168383	intercellular adhesion molecule 1 precursor	Affymetrix	RA>OA
AF042729	Hs.171776	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 1	Affymetrix	RA>OA
M64595	Hs.173466	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	Affymetrix	RA>OA
AA868382	Hs.198253	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	Affymetrix	RA>OA
AB006746	Hs.198282	phospholipid scramblase 1	Affymetrix	RA>OA
X00437	Hs.303157		Affymetrix	RA>OA
M59287			Affymetrix	RA>OA
AA725102	Hs.51305	v-maf	Affymetrix	RA>OA
		musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)		
M97935	Hs.21486	signal transducer and activator of transcription 1, 91kD	Affymetrix	RA>OA
X54134	Hs.31137	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E	Affymetrix	RA>OA
U89942	Hs.83354	lysyl oxidase-like 2	Affymetrix	RA>OA
AF099935	Hs.17839	TNF-induced protein	Affymetrix	RA>OA
M93056			Affymetrix	RA>OA
M97936			Affymetrix	RA>OA
AI887421	Hs.82547	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	Affymetrix	RA>OA
D50532	Hs.54403	macrophage lectin 2 (calcium dependent)	Affymetrix	RA>OA
AI813532	Hs.256278	tumor necrosis factor receptor 2 (75kD)	Affymetrix	RA>OA



U02020	Hs.239138	pre-B-cell colony-enhancing factor	Affymetrix	RA>OA
X05276	Hs.250641	tropomyosin 4	Affymetrix	RA>OA
AF006516	Hs.24752	spectrin SH3 domain binding protein 1	Affymetrix	RA>OA
AB018301	Hs.22039	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3	Affymetrix	RA>OA
AB010812	Hs.22900	secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte aquaporin 9	Affymetrix	RA>OA
AF052124	Hs.313	absent in melanoma 2	Affymetrix	RA>OA
AB008775	Hs.104624	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor for (CD32)	Affymetrix	RA>OA
AF024714	Hs.105115	superoxide dismutase 2, mitochondrial	Affymetrix	RA>OA
M28696	Hs.278443	DKFZP564A032 protein	Affymetrix	RA>OA
X62573	Hs.318885	solute carrier family 31 (copper transporters), member 2	Affymetrix	RA>OA
X07834		member 2	Affymetrix	RA>OA
AL050267	Hs.23889	dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 1	Affymetrix	RA>OA
U83461	Hs.24030	small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 5 (epithelial-derived n	Affymetrix	RA>OA
AB018285	Hs.321707	ARP3 actin-related protein 3 homolog	Affymetrix	RA>OA
AF007875	Hs.5085	adaptor-related protein complex 1, gamma 1 subunit	Affymetrix	RA>OA
X78686	Hs.89714	interleukin 8	Affymetrix	RA>OA
AF053712	Hs.115770	guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kD	Affymetrix	RA>OA
AF006083	Hs.5321	killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1	Affymetrix	RA>OA
AL050025	Hs.5344	thrombospondin 4	Affymetrix	RA>OA
M17017	Hs.624		Affymetrix	OA>RA
AI651024	Hs.15780		Affymetrix	OA>RA
AF038172	Hs.62661		Affymetrix	OA>RA
M55542			Affymetrix	OA>RA
U11276	Hs.169824		Affymetrix	OA>RA
Z19585	Hs.75774		Affymetrix	OA>RA
L27560			Affymetrix	OA>RA
M98539			Affymetrix	OA>RA
J00153			Affymetrix	OA>RA

M25079	Hs.155376	hemoglobin, beta	Affymetrix	OA>RA
M80482	Hs.170414	paired basic amino acid cleaving system 4	Affymetrix	OA>RA
L48215	Hs.155376	hemoglobin, beta	Affymetrix	OA>RA
AA524547	Hs.160318	phospholemman, isoform b precursor NM_005031	Affymetrix	OA>RA
AL038340			Affymetrix	OA>RA
AI381790	Hs.74120	adipose specific 2	Affymetrix	OA>RA
X00129	Hs.76461	retinol-binding protein 4, plasma precursor	Affymetrix	OA>RA
U66619	Hs.71622	SWI	Affymetrix	OA>RA
M30038	Hs.334455	alpha tryptase I precursor	Affymetrix	OA>RA
U13666	Hs.184907	G protein-coupled receptor 1	Affymetrix	OA>RA
L05144	Hs.1872	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)	Affymetrix	OA>RA
U39447	Hs.198241	copper containing amine oxidase 3 precursor	Affymetrix	OA>RA
AL049313			Affymetrix	OA>RA
AL050125			Affymetrix	OA>RA
D12485			Affymetrix	OA>RA
X78416	Hs.3155	casein, alpha	Affymetrix	OA>RA
AB028998	Hs.6147		Affymetrix	OA>RA
AB020629	Hs.38095	ATP-binding cassette, sub-family A member 8	Affymetrix	OA>RA
X03350	Hs.4	class I alcohol dehydrogenase, beta subunit	Affymetrix	OA>RA
AJ224677	Hs.7122	scrapie responsive protein 1	Affymetrix	OA>RA
AB018317	Hs.22201		Affymetrix	OA>RA
AF009314			Affymetrix	OA>RA
L77730			Affymetrix	OA>RA
D76435	Hs.41154	Zic family member 1 (odd-paired homolog, Drosophila)	Affymetrix	OA>RA
W28828	Hs.133988		Affymetrix	OA>RA
M73720			Affymetrix	OA>RA
M55150	Hs.73875	fumarylacetoacetase	Affymetrix	OA>RA
U13616	Hs.75893	ankyrin 3, isoform 2 NM_020987	Affymetrix	OA>RA
AB005293	Hs.103253	perilipin	Affymetrix	OA>RA
L07765	Hs.76688	carboxylesterase 1 (monocyte	Affymetrix	OA>RA
X82209	Hs.268515	meningioma 1	Affymetrix	OA>RA
J03507	Hs.78065	complement component 7 precursor	Affymetrix	OA>RA
AF013570	Hs.78344	smooth muscle myosin heavy chain 11, isoform SM1 NM_022870	Affymetrix	OA>RA
U70370	Hs.84136	paired-like homeodomain transcription factor 1	Affymetrix	OA>RA

		transcription factor 1		
U75744	Hs.88646	deoxyribonuclease I-like 3	Affymetrix	OA>RA
M60278	Hs.799	diphtheria toxin receptor (heparin-binding epidermal growth factor-like growth f	Affymetrix	OA>RA
AF042166	Hs.81008	filamin B, beta (actin binding protein 278)	Affymetrix	OA>RA
J00123			Affymetrix	OA>RA
AI207842	Hs.8272	prostaglandin D2 synthase (21kD, brain)	Affymetrix	OA>RA
AA128249	Hs.83213	fatty acid binding protein 4, adipocyte	Affymetrix	OA>RA
AA152406	Hs.114346	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 1 (muscle) precursor	Affymetrix	OA>RA
AF093118	Hs.11494	fibulin 5	Affymetrix	OA>RA
L38486	Hs.296049		Affymetrix	OA>RA
U66689			Affymetrix	OA>RA
AF049884	Hs.350266	Arg	Affymetrix	OA>RA
AB011089	Hs.12372	tripartite motif protein TRIM2	Affymetrix	OA>RA
AF060568			Affymetrix	OA>RA
AF059293	Hs.114948	cytokine receptor-like factor 1	Affymetrix	OA>RA
AC003107	Hs.1584	cartilage oligomeric matrix protein precursor	Affymetrix	OA>RA
J05037	Hs.76751	serine dehydratase	Affymetrix	OA>RA
D45371	Hs.80485	adipose most abundant gene transcript 1	Affymetrix	OA>RA
U78190			Affymetrix	OA>RA
U24578	Hs.444	serine	Affymetrix	OA>RA
M15856	Hs.180878	lipoprotein lipase precursor	Affymetrix	OA>RA
AF055033	Hs.107169	insulin-like growth factor binding protein 5	Affymetrix	OA>RA
AA976838	Hs.268571	apolipoprotein C-I precursor	Affymetrix	OA>RA
L13698	Hs.65029	growth arrest-specific 1	Affymetrix	OA>RA
AB020316	Hs.134015	uronyl-2-sulfotransferase	Affymetrix	OA>RA
U32324	Hs.64310	interleukin 11 receptor, alpha	Affymetrix	OA>RA
S67070	Hs.78846	heat shock 27kD protein 2	Affymetrix	OA>RA
M12529	Hs.169401	apolipoprotein E	Affymetrix	OA>RA
D50495	Hs.80598	transcription elongation factor A (SII), 2	Affymetrix	OA>RA
D00632	Hs.336920	plasma glutathione peroxidase 3 precursor	Affymetrix	OA>RA
AI760613	Hs.29283		Affymetrix	RA>OA
AW014646	Hs.303157		Affymetrix	RA>OA
W74027	Hs.132906	19A24 protein	Affymetrix	RA>OA

W72338	Hs.23703		Affymetrix	RA>OA
AI805006	Hs.8882		Affymetrix	RA>OA
W67655			Affymetrix	RA>OA
AA631460	Hs.285814		Affymetrix	RA>OA
AI741321	Hs.10760	asporin (LRR class 1)	Affymetrix	RA>OA
AI983115	Hs.132781	class I cytokine receptor	Affymetrix	RA>OA
AI535730	Hs.262958		Affymetrix	RA>OA
AA977937	Hs.102308	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8	Affymetrix	RA>OA
AA447232	Hs.334838		Affymetrix	RA>OA
AI720806	Hs.49943		Affymetrix	RA>OA
W23237	Hs.296162		Affymetrix	RA>OA
AI762695	Hs.146381	RNA binding motif protein, X chromosome	Affymetrix	RA>OA
AI653211	Hs.96657		Affymetrix	RA>OA
AA633405	Hs.1101	POU domain, class 2, transcription factor 2	Affymetrix	RA>OA
N78018	Hs.267566	hypothetical protein FLJ20371	Affymetrix	RA>OA
AI625959	Hs.112242		Affymetrix	RA>OA
T66196	Hs.111554	ADP-ribosylation factor-like 7	Affymetrix	RA>OA
AI697841	Hs.20450	BCM-like membrane protein precursor NM_014036	Affymetrix	RA>OA
AA569128	Hs.283021	chloride intracellular channel 5	Affymetrix	OA>RA
R53594	Hs.260164		Affymetrix	OA>RA
AI970898	Hs.234898		Affymetrix	OA>RA
AI972390	Hs.348493		Affymetrix	OA>RA
N23769	Hs.26691		Affymetrix	OA>RA
AI806324	Hs.28625		Affymetrix	OA>RA
N28741	Hs.75354		Affymetrix	OA>RA
AL040912	Hs.31595	oligodendrocyte transmembrane protein	Affymetrix	OA>RA
AI681917	Hs.3321		Affymetrix	OA>RA
AW006235	Hs.41502	hypothetical protein FLJ21276	Affymetrix	OA>RA
W73819	Hs.352100		Affymetrix	OA>RA
T77033	Hs.182364		Affymetrix	OA>RA
AW015787	Hs.237731		Affymetrix	OA>RA
N30858	Hs.44234	triggering receptor expressed on myeloid cells 2	Affymetrix	OA>RA
AI810669	Hs.44829		Affymetrix	OA>RA
N49922	Hs.1787	proteolipid protein1 (Pelizaeus-Merzbacher disease, spastic paraplegia 2, uncomp	Affymetrix	OA>RA
AA082546	Hs.48516		Affymetrix	OA>RA

AI694320	Hs.6295	thyrotropin-releasing hormone degrading ectoenzyme	Affymetrix	OA>RA
AI632283	Hs.47448		Affymetrix	OA>RA
AA039324	Hs.201925		Affymetrix	OA>RA
AA877186	Hs.90250		Affymetrix	OA>RA
R42166	Hs.94000		Affymetrix	OA>RA
AI631882	Hs.6510		Affymetrix	OA>RA
W68636	Hs.168640	ankyllosis, progressive homolog NM_054027	Affymetrix	OA>RA
AA700227	Hs.10119	ankyllosis, progressive homolog	Affymetrix	OA>RA
AI948584	Hs.350495		Affymetrix	OA>RA
AI678080	Hs.141693		Affymetrix	OA>RA
AI732274	Hs.11006		Affymetrix	OA>RA
AI341383	Hs.349764		Affymetrix	OA>RA
Z99386	Hs.173638		Affymetrix	OA>RA
W95023	Hs.173933		Affymetrix	OA>RA
AI860775	Hs.98506		Affymetrix	OA>RA
AA464846	Hs.103262		Affymetrix	OA>RA
AI751698	Hs.184907	G protein-coupled receptor 1	Affymetrix	OA>RA
AA545730	Hs.293821		Affymetrix	OA>RA
AA181060	Hs.349283		Affymetrix	OA>RA
AA195184			Affymetrix	OA>RA
AI680541	Hs.23767	hypothetical protein FLJ12666	Affymetrix	OA>RA
AI659533	Hs.348490		Affymetrix	OA>RA
AI750575	Hs.173933		Affymetrix	OA>RA
AI870335	Hs.32450		Affymetrix	OA>RA
AA160945	Hs.14479		Affymetrix	OA>RA
AI936699	Hs.193784		Affymetrix	OA>RA
AI130027	Hs.293539		Affymetrix	OA>RA
AA081093	Hs.68055		Affymetrix	OA>RA
AA142913	Hs.71721		Affymetrix	OA>RA
AI984000	Hs.37482	COPZ2 for nonclathrin coat protein zeta-COP	Affymetrix	OA>RA
AI864898	Hs.43125		Affymetrix	OA>RA
AI670876	Hs.44276	homeo box C10	Affymetrix	OA>RA
AA541787	Hs.23837		Affymetrix	OA>RA
AA775711	Hs.348392		Affymetrix	OA>RA
AI659927	Hs.6634		Affymetrix	OA>RA
AI084224	Hs.53542		Affymetrix	OA>RA
AI123555	Hs.81796		Affymetrix	OA>RA
W73230	Hs.7913		Affymetrix	OA>RA
W27376	Hs.8395	hypothetical protein FLJ10781	Affymetrix	OA>RA
AW022607	Hs.12482	glyceronephosphate O-acetyltransferase	Affymetrix	OA>RA
W70242	Hs.58086		Affymetrix	OA>RA

W25528.	Hs.89319		Affymetrix	OA>RA
AA947123	Hs.8861		Affymetrix	OA>RA
AA528821	Hs.235857		Affymetrix	OA>RA
AA131648	Hs.23767	hypothetical protein FLJ12666	Affymetrix	OA>RA
R12398	Hs.21075	GTF2I repeat domain- containing 1, isoform 1 NM_005685	Affymetrix	OA>RA
W52683	Hs.107260	hypothetical protein DKFZp586H0623	Affymetrix	OA>RA
W72194	Hs.108924	ponsin NM_015385	Affymetrix	OA>RA
AA885516	Hs.104627		Affymetrix	OA>RA
W68796	Hs.237731		Affymetrix	OA>RA
AI879337	Hs.323432	mammalian inositol hexakisphosphate kinase 2	Affymetrix	OA>RA
W45581	Hs.23133		Affymetrix	OA>RA
N98637	Hs.7759		Affymetrix	OA>RA
AI809953	Hs.123933		Affymetrix	OA>RA
T68423	Hs.11873		Affymetrix	OA>RA
AL044670	Hs.182364		Affymetrix	OA>RA
AA779895	Hs.19339		Affymetrix	OA>RA
AI719167	Hs.12731		Affymetrix	OA>RA
T99215	Hs.168640	ankylosis, progressive homolog NM_054027 ankylosis, progressive homolog	Affymetrix	OA>RA
AA534296	Hs.20953		Affymetrix	OA>RA
AI819043	Hs.21342		Affymetrix	OA>RA
AI762879	Hs.86437		Affymetrix	RA>OA
W61000	Hs.238730		Affymetrix	RA>OA
AL043192	Hs.103378		Affymetrix	RA>OA
AI741313	Hs.103657		Affymetrix	RA>OA
AI031674	Hs.236494	ras-related GTP-binding protein	Affymetrix	RA>OA
AA670193			Affymetrix	RA>OA
AW005250	Hs.238936		Affymetrix	RA>OA
AA682496	Hs.270737	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	Affymetrix	RA>OA
AI128225	Hs.914		Affymetrix	RA>OA
AW026543	Hs.238936		Affymetrix	RA>OA
AI991095	Hs.293441		Affymetrix	RA>OA
AI872510	Hs.181125		Affymetrix	RA>OA
AI828404	Hs.300697		Affymetrix	RA>OA
AI807353	Hs.237868	interleukin 7 receptor	Affymetrix	RA>OA
AL048481	Hs.11571		Affymetrix	RA>OA
AW014626	Hs.10949		Affymetrix	RA>OA
AI400414			Affymetrix	RA>OA
AI655112	Hs.16179	hypothetical protein FLJ23467	Affymetrix	RA>OA
AI936345	Hs.95549	hypothetical protein	Affymetrix	RA>OA

AI961907	Hs.179573	alpha 2 type I collagen preproprotein	Affymetrix	RA>OA
AI743730	Hs.30822	hypothetical protein FLJ11110	Affymetrix	RA>OA
AI990512	Hs.34192		Affymetrix	RA>OA
AI741715	Hs.1466	glycerol kinase	Affymetrix	RA>OA
T66305	Hs.12920	hypothetical protein FLJ20668	Affymetrix	RA>OA
AA424160	Hs.165909		Affymetrix	RA>OA
AI075407	Hs.296083		Affymetrix	RA>OA
AA811088	Hs.24143	WASP-interacting protein	Affymetrix	RA>OA
AI978918	Hs.179608	retinol dehydrogenase homolog	Affymetrix	RA>OA
AA740831	Hs.193514		Affymetrix	RA>OA
W84421	Hs.349096		Affymetrix	RA>OA
AA233208	Hs.91165	hypothetical protein	Affymetrix	RA>OA
AA886976	Hs.95821	osteoclast stimulating factor 1	Affymetrix	RA>OA
AA864400	Hs.71215	docking protein 2, 56kD	Affymetrix	RA>OA
AI073984	Hs.14453	interferon consensus sequence binding protein 1	Affymetrix	RA>OA
AI983633	Hs.179573	alpha 2 type I collagen preproprotein	Affymetrix	RA>OA
AI564488	Hs.300697		Affymetrix	RA>OA
AI655781	Hs.237868	interleukin 7 receptor	Affymetrix	RA>OA
AA814195	Hs.184465	hypothetical protein FLJ11259	Affymetrix	RA>OA
AI916783	Hs.234149	hypothetical protein FLJ20647	Affymetrix	RA>OA
AA829355	Hs.267993	hypothetical protein FLJ10143	Affymetrix	RA>OA
N66595	Hs.24283		Affymetrix	RA>OA
AA165400	Hs.10927		Affymetrix	RA>OA
AI478759	Hs.234149	hypothetical protein FLJ20647	Affymetrix	RA>OA
AI655719	Hs.2157	Wiskott-Aldrich syndrome protein	Affymetrix	RA>OA
N63815	Hs.110121	SEC7 homolog	Affymetrix	RA>OA
AW001184	Hs.44672	hypothetical protein FLJ10470	Affymetrix	RA>OA
N21390	Hs.5888		Affymetrix	RA>OA
AA587944	Hs.259737	FN5 protein	Affymetrix	RA>OA
AI951459	Hs.7337	hypothetical protein FLJ10936	Affymetrix	RA>OA
AA464464	Hs.10949		Affymetrix	RA>OA
AI692538	Hs.11135		Affymetrix	RA>OA
AI817147	Hs.181301	cathepsin S	Affymetrix	RA>OA
AI263085	Hs.17914	CD20-like precursor	Affymetrix	RA>OA
W58252	Hs.182793	golgi phosphoprotein 2	Affymetrix	RA>OA
AA056180	Hs.70704		Affymetrix	RA>OA

AA224174	Hs.111099	Gene 33	Affymetrix	OA>RA
AI571452	Hs.11169		Affymetrix	OA>RA
AA155952	Hs.349303		Affymetrix	OA>RA
W68504	Hs.191098		Affymetrix	OA>RA
AI200456	Hs.48516		Affymetrix	OA>RA
AW003093	Hs.349764		Affymetrix	OA>RA
AI190027	Hs.38034	hypothetical protein FLJ20374	Affymetrix	OA>RA
R52934	Hs.8562		Affymetrix	OA>RA
W44633	Hs.301296	homeo box C10	Affymetrix	OA>RA
AW024474	Hs.44276		Affymetrix	OA>RA
AI806502	Hs.334800		Affymetrix	OA>RA
AI492370	Hs.105606	hypothetical protein FLJ20512	Affymetrix	OA>RA
AW021179	Hs.90443	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8 (23kD) (NADH- coenzyme Q reductase	Affymetrix	OA>RA
AI679110	Hs.323067	poly(A)-binding protein, nuclear 1	Affymetrix	OA>RA
R85633			Affymetrix	OA>RA
N91161	Hs.117176		Affymetrix	OA>RA
AW020657		hypothetical protein FLJ10970	Affymetrix	OA>RA
AI871043	Hs.173233		Affymetrix	OA>RA
N39237	Hs.44977	secreted protein of unknown function	Affymetrix	OA>RA
AI949833	Hs.21914		Affymetrix	OA>RA
AA679297	Hs.109494		Affymetrix	OA>RA
AI962647	Hs.182364	AD026 protein	Affymetrix	OA>RA
AL037611	Hs.285902		Affymetrix	OA>RA
AI871278	Hs.301804		Affymetrix	OA>RA
AI357650	Hs.28847	hypothetical protein LOC57333	Affymetrix	OA>RA
AI149793	Hs.38034		Affymetrix	OA>RA
AI797684	Hs.39619	CSR1 protein	Affymetrix	OA>RA
R52250	Hs.348297		Affymetrix	OA>RA
AI669738	Hs.128856		Affymetrix	OA>RA
AA058770	Hs.18987		Affymetrix	OA>RA
AI039005	Hs.164680		Affymetrix	OA>RA
AI936560	Hs.6136		Affymetrix	OA>RA
AA521373	Hs.9469	pleckstrin homology domain-containing, family A (phosphoinositide binding specif	Affymetrix	OA>RA
			Affymetrix	OA>RA
H15888	Hs.27621	sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembran	Affymetrix	OA>RA
AI333793	Hs.337062		Affymetrix	OA>RA
AA523172	Hs.103135		Affymetrix	OA>RA



AI860960	Hs.352081	nuclear factor I clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testos	Affymetrix	OA>RA
AI355848	Hs.35841		Affymetrix	OA>RA
AI982754	Hs.75106		Affymetrix	OA>RA
AI800218	Hs.289019	latent transforming growth factor beta binding protein 3	Affymetrix	OA>RA
AW016356	Hs.126857	hypothetical protein EST00098	Affymetrix	OA>RA
AA968552	Hs.25523		Affymetrix	OA>RA
AI634557	Hs.28107		Affymetrix	OA>RA
AW025494	Hs.95867		Affymetrix	OA>RA
AA628405	Hs.339352	dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide.3.....	Affymetrix	OA>RA
AI810399	Hs.55940		Affymetrix	OA>RA
AA029735	Hs.159993		Affymetrix	OA>RA
AA723927	Hs.209569		Affymetrix	OA>RA
AI799784	Hs.49696		Affymetrix	OA>RA
AI817330	Hs.110477		Affymetrix	OA>RA
AI990803	Hs.293782		Affymetrix	OA>RA
AA034418	Hs.30627	DKFZP434N161 protein hypothetical protein CGI-135 protein TGF $\beta$ -induc early growth response 2 IG-ALPHA2-C REGION KIAA0618 AK1	Affymetrix	OA>RA
AA115295	Hs.284208		Affymetrix	OA>RA
AI673281	Hs.181444		Affymetrix	OA>RA
W63805	Hs.84344		Affymetrix	OA>RA
AA427597			Unigene	NS>RA
AA806239		IG-ALPHA2-C REGION KIAA0618 AK1	Unigene	RA>NS
AB014518			Unigene	RA>NS
AB021871			RDA, Unigene	RA>OA, RA>NS
AF 000984		DBY altern transcript 2 cornified envelope precursor	Affymetrix	NS>RA
AF 001691			Affymetrix	NS>RA
AF005058		CXC		
AF0605668		leukemia zink finger PLZF	Affymetrix	OA>RA
AF068293		HDCMB07P/PCM-1	Unigene	RA>NS
AF105036		GKLF	RDA	OA>NS
AF182035		a Actin	RDA	OA>NS
AF182035		myosin light chain	RDA	OA>NS
AF216292		BIP		
AF218004		CSNK1A1	Unigene	RA>NS
AJ000542		natural killer cell receptor p58	RDA	RA>OA
J05008		EDN1	Affymetrix	NS>RA
L08187		cytokine receptor EBI 3	RDA	RA>OA
L31581		EBI1/CCR7	Affy	RA>NS
L37036		ENA-78	=Affymetrix	RA>OA

M10988	TNF $\mu$		
M19997	elongation factor 2	RDA	RA>OA
M29469	Ig rearranged k chain (VJ regions)	RDA, Affymetrix	RA>OA
M31164	TSG6	RDA, Unigene	RA>OA, RA>NS
M83248	OSTP (Osteopontin)	RDA, Affymetrix	RA>OA
NM_002450	Metallomethionein	Unigene	NS>RA
NM_003573	TGFB-BP4	Unigene	RA>NS
NM_000362	TIMP-3	RDA	NS>RA
NM_000396	Cathepsin K	RDA	RA>OA, OA>NS
NM_0006091	SDF1	RDA	OA>NS
NM_001908	Cathepsin B	RDA	OA>NS
NM_002084	glutathion peroxidase 3	RDA	NS>RA
NM_002229	Jun B	Unigene	NS>RA
NM_002989	SLC	Unigene	RA>NS
NM_003966	SEMA5A	RDA	RA>OA
NM_004039	Annexin II	RDA	RA>OA, OA>NS
NM_005368	Myoglobin	RDA	OA>NS
NM_006472	VDUP1	RDA, Unigene	NS>RA
NM_007016	Mysin light polypeptid2	RDA	OA>NS
NM_015675	GADD45B/MYD118	RDA, Unigene	NS>RA
R75775	EGR1	Unigene	NS>RA
U070136	megakaryocyte stimulating factor	RDA, Unigene	NS>RA
U34690	CORO1A/ p57	Unigene	RA>NS
U93569	L1 element	RDA, Unigene	RA>OA, RA>NS
X03754	SCYA3 (MIP a) /GOS19	Unigene	RA>NS
X0523	MMP1		
X14723	Clustrin / SP40	RDA, Unigene	NS>RA
X15332	collagen III a1	RDA, Unigene	RA>OA
X54629	c-myc	RDA, Unigene	NS>RA
X54629	pHL-1 gene	RDA	NS>RA
X58122	Nebulin	RDA	OA>NS
X62996	mitochondrial mRNA	RDA	OA>NS
X63596	TRE-2	RDA	RA>OA
X65968	PMP22	Unigene	RA>NS
X88971	HLA DRB1	RDA	RA>OA
X94771	EMP3	Unigene	RA>NS
XM 008868	latent transforming growth factor beta binding prot. LTBP4	RDA, Unigene	NS>RA
XM_031289	interleukin 8	=Affymetrix	RA>OA
XM012651	collagen I a1	RDA	RA>OA

**Zusammenstellung der Proteine**Tabelle 2:

<b>Protein</b>	<b>Beispiel für Accession</b>
78 kDa glucose-regulated protein precursor (GRP 78) (Immunoglobulin heavy chain binding protein) (BIP) (Endoplasmic reticulum lumenal Ca <sup>2+</sup> binding protein grp78)	P11021
Citrullinierte Peptide (d.h. Peptide, die die deiminierte Form der Aminosäure Arginin [Citrullin] beinhalten)	
Sa-Antigen	
RA33 / Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2 / hnRNP B1)	P22626
Calpain inhibitor (Calpastatin) (Sperm BS-17 component)	P20810
Calreticulin precursor (CRP55) (Calregulin) (HACBP) (ERp60)	P27797
Synovial stimulatory protein P205	P80697
Filaggrin precursor	P20930
Fibrin	
Fibrinogen alpha/alpha-E chain precursor [Contains: Fibrinopeptide A]	P02671
Fibrinogen beta chain precursor [Contains: Fibrinopeptide B]	P02675
Fibrinogen gamma chain precursor (PRO2061)	P02679
DnaJ	
Ig gamma-1 chain C region	P01857
Ig gamma-2 chain C region	P01859
Ig gamma-3 chain C region (Heavy chain disease protein) (HDC)	P01860
Ig gamma-4 chain C region	P01861
60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor (Hsp60) (60 kDa chaperonin) (CPN60) (Heat shock protein 60) (HSP-60) (Mitochondrial matrix protein P1) (P60 lymphocyte protein) (HuCHA60)	P10809
EBNA-1 NUCLEAR PROTEIN	P03211
IR-3, Internal Repeat Region (in EBNA-1 u.a. Proteinen)	
Chitinase-3 like protein 1 precursor (Cartilage glycoprotein-39) (GP-39) (39 kDa synovial protein) (YKL-40)	P36222
Collagen alpha 1(II) chain precursor [Contains: Chondrocalcin]	P02458
CH65, Chondrocyte Antigen 65	
Collagen-binding protein 2 precursor (Colligin 2) (Rheumatoid arthritis related antigen RA-A47)	P50454
47 kDa heat shock protein precursor (Collagen-binding protein 1) (Colligin 1)	P29043
Chitinase 3-like protein 2 precursor (YKL-39) (Chondrocyte protein 39)	Q15782
Chitinase 3-like protein 2 precursor (YKL-39) (Chondrocyte protein 39)	Q15783

Chitinase 3-like protein 2 precursor (YKL-39) (Chondrocyte protein 39)	Q15749
Fructose-bisphosphate aldolase A (Muscle-type aldolase) (Lung cancer antigen NY-LU-1)	P04075
Proteoglycan link protein precursor (Cartilage link protein) (LP)	P10915
Matrix metalloproteinase-19 precursor (MMP-19) (Matrix metalloproteinase RASI)	Q99542
MMP-19 (matrix metalloproteinase)	CAA63299
Aggrecan core protein precursor (Cartilage-specific proteoglycan core protein) (CSPCP) (Chondroitin sulfate proteoglycan core protein 1)	P16112
Ezrin (p81) (Cytovillin) (Villin 2)	P15311
Radixin	P35241
Moesin (Membrane-organizing extension spike protein)	P26038

Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden, ohne auf diese Beispiele beschränkt zu sein.

5

### Ausführungsbeispiele

#### *Beispiel 1: Anwendung in der klinischen Diagnostik*

Ein Patient mit Gelenkbeschwerden seit 4 Monaten hat asymmetrische Schwellungen und Schmerzhaftigkeit in 2 Fingergrund- und 1 Fingermittelgelenk sowie dem rechten Handgelenk. Die Morgensteifigkeit beträgt ca 30 Minuten. Radiologisch zeigen sich beginnende erosive Veränderungen in einem Zehengrundgelenk. Das C-reaktive Protein ist im Normbereich, die Senkung leicht erhöht, der Rheumafaktor und HLA-DR4 negativ. Es besteht keine familiäre Vorbelastung hinsichtlich einer entzündlich rheumatischen Erkrankung.

Es erfolgt eine ambulante Vorstellung zur minimalinvasiven arthroskopischen Entnahme einer Synovialisbiopsie am rechten Handgelenk. Von 4 Gewebeproben mit je ca 10mg Gewicht wird eine kleine Probe in Formalin fixiert für die nachfolgende histologische Beurteilung. Die verbleibenden Gewebestücke werden in RNA-Lysepuffer aufgenommen, zerkleinert und die RNA nach Standardprotokoll extrahiert. Nach Umschreibung in cDNA erfolgt die in vitro Transkription in eine Biotin-markierte cRNA als Abschrift der cDNA. Die cRNA wird fragmentiert und eingesetzt für die Hybridisierung auf dem DNA-Array.

Der Array wird von einem kommerziellen Anbieter für die Fertigung von DNA-Arrays wie z.B. Affymetrix hergestellt. Dort werden aus den Sequenzen in der Tabelle 1 und den für die Proteine in Tabelle 2 kodierenden Gensequenzen geeignete Oligo-Nucleotide bestimmt, die eine spezifische Hybridisierung mit den jeweiligen cRNA-Sequenzen ermöglichen. Diese Sequenzen werden entweder

als Oligonucleotide synthetisiert und auf einen Array-Träger gedruckt oder direkt z.B. mit photolithographischen Verfahren auf dem Träger synthetisiert.

Die Hybridisierung erfolgt nach vorgegebenem Protokoll des Herstellers. Der DNA-Array wird mit einem Scanner ausgelesen. Die Übersetzung der Bildinformation in Expressions-Signale erfolgt über

Standard-Software wie z.B. „Micro-Array Suite“ von Affymetrix. Es liegen nun die Signale zur RNA-Expressionsstärke der in Tabelle 1 und 2 genannten Gene bzw. Proteine vor. Auf der Basis dieser hier neu definierten Auswahl von Genen für die diagnostische Beurteilung und Therapieentwicklung bei Gelenkerkrankungen wurden in Vorversuchen klinisch und histologisch charakterisierte Gewebeproben nach Clusteranalyse hierarchisch zueinander eingeteilt. Durch die vergleichende

Assoziation mit klinischen Befunden wurde diese Einteilung insbesondere in Abhängigkeit von der Form der Erkrankung (Arthrose, reaktive Arthritis, rheumatoide Arthritis, Untergruppen der rheumatoiden Arthritis), der Aktivität der Erkrankung und damit der Prognose sowie der

Beeinflussbarkeit der pathologisch veränderten Genexpression durch ein gegebenes Medikament getroffen. Die Signaldata des oben genannten Patienten werden nun mit dieser Datenbank verglichen.

Dadurch kann eine Zuordnung zu einer dieser Gruppen erfolgen und auf die dazugehörigen klinischen Assoziationen rückgeschlossen werden. Es ergeben sich somit Aussagen zu der Diagnose, der Aktivität, der Prognose und den Therapieoptionen im individuellen Krankheitsfall.

#### *Beispiel 2: Anwendung für Therapiebeurteilung*

Ein Patient mit chronischer Gelenkentzündung seit 5 Jahren und der Diagnose rheumatoide Arthritis

hat fortschreitende spezifische radiologische Veränderungen in mehreren Fingergelenken, begleitet von Schmerzen und Schwellungen in mehreren Fingergelenken, dem linken Ellbogengelenk und dem rechten Sprunggelenk trotz aktueller Basistherapie mit 15mg Methotrexat pro Woche. Es erfolgt eine ambulante Vorstellung zur minimalinvasiven arthroskopischen Entnahme einer Synovialisbiopsie am

linken Ellbogengelenk. Mehrere Proben von ca. 30mg Gesamtgewicht werden in Lysepuffer aufgenommen, zerkleinert und die RNA extrahiert. Die Aufarbeitung der Probe erfolgt vergleichbar zu dem Vorgehen in Beispiel 1. Es wird der gleiche DNA-Chip wie in Beispiel 1 zur Analyse verwendet.

Nach Hybridisierung, Auslesen des Hybridisierungsergebnisses in eine Bilddatei und Übersetzen in eine Signalinformation für jedes der untersuchten Gene erfolgt eine Zuordnung zu definierten Expressionsmustern. Diese wurden in Vorversuchen festgelegt unter Verwendung der hier neu

definierten Auswahl von Genen aus Tabelle 1 und 2. Dabei wurde die Veränderung des Expressionsprofils einer Probe in Abhängigkeit von der zugehörigen Gelenkerkrankung unter Einfluss definierter Medikamente mit definierten Konzentrationen analysiert. Die Profile wurden hierarchisch eingeteilt unter Berücksichtigung der Assoziation, zu den verwendeten Medikamenten und der verwendeten Dosis. Wird mit diesen definierten Expressionsmustern die Patientenprobe verglichen,

wird anhand der Zuordnung zu einem bestimmten Muster und den damit assoziierten Wirksamkeitsaussagen eine Abschätzung möglich, ob das gegebene Medikament Methotrexat mit

einer höheren Dosierung erfolgreich sein könnte, oder ob eine Umstellung erfolgen sollte auf ein Medikament, dessen Wirkungsprofil am besten die pathologischen Veränderungen in diesem individuellen Fall zu beeinflussen vermag.

*Beispiel 3: Autoreaktivitätsprofile bei der RA*

- 5 Die RA unterscheidet sich von anderen rheumatischen sowie von anderen entzündlichen Erkrankungen durch die Ausbildung von Autoantikörpern. Dabei wird eine Diskriminierung zwischen RA und nicht-RA nicht durch eine Antikörper-Reaktivität gewährleistet, sondern durch verschiedene Profile unterschiedlicher Autoreaktivitäten. Es ist somit möglich, über die Bestimmung der RA-spezifischen Autoreaktivitätsprofile eine gesicherte Diagnostik zu erstellen, Therapieverläufe zu
- 10 kontrollieren und Vorsorgeuntersuchungen durchzuführen.

- Antikörper richten sich gegen Antigene oder spezifischer gegen Epitope, die bei einer spezifischen Antikörper-Antigen-Reaktion von den Paratopen gebunden werden. Epitop ist per Definition der Bereich eines Antigens, der mit einem Antikörper spezifisch (d.h. mit dessen Paratop) in Wechselwirkung tritt. Üblicherweise versteht man hierunter eine 16 bis 20 Aminosäuren große
- 15 Peptidsequenz eines Proteins. Diese Sequenz kann konsekutiv (kontinuierliches Epitop) oder unterbrochen (diskontinuierliches Epitop) sein. Typischerweise sind jedoch für die spezifische Wechselwirkung von Antikörper und Antigen aber nur wenige Aminosäuren, in seltenen Fällen auch nur eine einzige Aminosäure, notwendig und hinreichend. Zwischenzeitlich ist bekannt, dass selbst Nukleinsäuren als Antigen fungieren können. Besondere Bedeutung gewinnen zunehmend
- 20 posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierung, Acylierung, Glykosylierung, Methylierung, Deiminierung u.a.. Da diese Modifikationen oftmals regulatorische Funktion aufweisen, scheinen diese in besonderer Weise Zielstruktur von Antikörpern zu sein, insbesondere unter pathologischen Bedingungen. Da bei einigen RA-assoziierten Autoantigenen schon gezeigt wurde, dass bestimmte posttranslationale Modifikationen Epitope für Autoantikörper bilden, muss besonderes
- 25 Augenmerk darauf gelegt werden, dass diese Strukturen für das Testsystem realisiert werden.

- Die in Tabelle 2 gelisteten Proteine sind als RA-assoziierte Autoantigene beschrieben. Die Relevanz der meisten dieser Einzelkomponenten für die Diagnostik der RA ist jedoch gering bzw. nicht ersichtlich. Das gleiche gilt für die auf mRNA-Ebene überexprimierten Gene, die in Tabelle 1 gelistet sind. Für sich genommen sind diese Komponenten nicht geeignet, die RA-Diagnostik wesentlich zu
- 30 verbessern. Dies zeigt sich daran, dass praktisch die Mehrheit der in Tabelle 1 und 2 gelisteten Proteine nicht für diese Zwecke zum Patent angemeldet ist. Lediglich einige wenige Proteine sind derart charakteristisch, dass eine Relevanz für die RA angenommen wurde. Dies betrifft z.B. das BiP (Heavy Chain Binding Protein), das Ziel einer Immunreaktion bei der RA ist. Hier ist beispielsweise eine posttranslationale Modifikation in Form einer Glykosylierung zu berücksichtigen, da diese
- 35 Bestandteil von Epitopen ist, die sowohl für die Erkennung von Autoantikörpern aus RA als auch für die Unterscheidung zwischen RA- und nicht-RA-Autoantikörpern erforderlich ist. Des weiteren wurde

die posttranslational von Arginin in Citrullin umgewandelte Aminosäure als wesentliches Epitop für RA-assoziierte Autoantikörper beschrieben(6). Eine ähnlich hohe Bedeutung für die RA-Diagnostik weisen das Sa-Antigen (5), das RA33-Antigen, und das Calpastatin auf.

Dennoch waren diese Komponenten für sich genommen nicht geeignet, eine eindeutige

5 Diagnosestellung der RA oder gar ein Therapiemonitoring zu ermöglichen. Der hier erfindungsgemäß dargestellte neue Ansatz bezieht sich auf das Immunom der RA. Das Immunom der RA umfasst die

Gesamtheit der autoreaktiven Antikörper, die in der RA auftreten sowie die Gesamtheit der von diesen erkannten Autoantigene bzw. Auto-Epitope. Unerwarteterweise konnte festgestellt werden, dass es

10 erstmalig möglich ist, durch Betrachtung der Kombination RA-assoziiierter Autoantikörper eine Erkrankung eindeutig als RA zu definieren. Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass unterschiedliche Muster von Autoantikörpern existieren, die ausschließlich bei der RA auftreten. Diese Muster

beziehen auch solche Autoantigene bzw. Autoreaktivitäten mit ein, die für sich genommen unbedeutend für die RA erschienen. Dies ist umso überraschender, als erste Schritte in diese Richtung

15 von anderen Gruppen nicht zu diesem Ergebnis geführt haben, obwohl betont wird, dass die wichtigsten Autoantigene von acht verschiedenen Autoimmunerkrankungen des Menschen zum Einsatz kamen (11). Das gleiche trifft für einen Ansatz zu, in dem Autoantigene eingesetzt wurden, die

für eine andere rheumatische Erkrankung, den systemischen Lupus erythematodes (SLE), relevant sind. Offenbar besteht der wesentliche Unterschied zwischen bereits publizierten Ansätzen und dem

hier beschriebenen zum einen in der Art der Analyse (multivariant), zum anderen in der Komposition

20 der Autoantigene. Erst eine genügend hohe Anzahl von RA-relevanten Autoreaktivitäten ermöglicht eine eindeutige Diagnosestellung. Somit stellt also die Gesamtheit der RA-assoziierten Autoantikörper

und Autoantigene eine Information dar, die – zusammen mit anderen Techniken (ProteinArray-Technologie (27), Datenverarbeitung) – u.a. als Werkzeug für die Diagnostik und Klassifizierung der

RA nutzbar gemacht werden kann. Auch ein Experte auf diesem Gebiet hätte durch Analogieschlüsse nicht auf diesen Nutzungsgrad kommen können. Das Immunom der RA oder auch bereits Teilmengen

des Immunoms der RA können dazu genutzt werden, die RA eindeutig von anderen Erkrankungen oder dem gesunden Zustand abzugrenzen. Eine wirtschaftliche Nutzung der unerwarteten Erfindung

ist darüber hinaus auch erst durch die in der heutigen Zeit vorhandenen oder noch in der Entwicklung befindlichen Möglichkeiten der High-Throughput-Technologien möglich. Dies bezieht sich

30 insbesondere auf die Multiparameter-Analyse von Autoreaktivitäten, da es hier erforderlich ist, eine Vielzahl von Untersuchungen parallel und unter Einsatz kleinster Patienten-Probenmengen

durchzuführen.

Proteine oder Protein-Teilsequenzen der in Tab. 2 aufgeführten Komponenten oder Proteine und Protein-Teilsequenzen, die von den in Tab. 1 aufgeführten Genen kodiert werden, inclusive der ggf.

35 für die Diskriminierung von RA und nicht-RA erforderlichen posttranslationalen Modifikationen, werden synthetisiert und für die Erstellung von Autoreaktivitätsprofilen bereitgestellt. Die Synthese

kann durch einen beliebigen molekularbiologischen an sich bekannten Ansatz erfolgen oder aber

durch einen beliebigen proteinchemischen Ansatz. Darüber hinaus ist auch die halbarteifizielle (in vitro-Translation) oder artefizielle Synthese nach dem Stand der Technik geeignet, die genannten Proteine oder Protein-Teilsequenzen herzustellen.

#### *ProteinArray / PeptidArray (28)*

- 5 Proteine oder Proteinteilsequenzen gemäß Tabelle 2 oder 1 werden alle oder nur eine für die immunomische Diskriminierung von Krankheitsbildern nützliche Auswahl dieser dazu verwendet, eine Testmöglichkeit zu erstellen, die geeignet ist, den Autoreaktivitätsstatus eines Individuums zu bestimmen. Dies betrifft insbesondere die Auswahl von Citrullin, BiP, p205, IgG, Calpastatin, RA33, Sa-Antigen und Calreticulin. Hierzu werden die Proteine getrennt in räumlich auflösbaren Positionen
- 10 auf eine Trägermatrix nach bekanntem aufgebracht. Position und Identität eines jeden immobilisierten Proteins, Peptids, modifizierten Proteins oder modifizierten Peptids sind bekannt. Das Microformat erlaubt den parallelen Nachweis von tausenden unterschiedlichen Antigenen und/oder Autoantigenen (Proteinen / Peptiden) im Submikroliter-Bereich von Humanseren. Bevorzugt ist die Erstellung eines ProteinArray, eines Hochdichte-Filters oder eines Hoch-Dichte Glasträgers oder einer anderen im
- 15 Hochdichte-Verfahren hergestellten Matrix, die beschichtet oder unbeschichtet mit den Proteinen bzw. Protein-Teilsequenzen gekoppelt wird. Beispielsweise können Proteine oder Protein-Teilsequenzen auf derivatisierte oder beschichtete/aktivierte Glasträger aufgestempelt werden, oder aber der Auftrag erfolgt im Ink Jet-Verfahren, kapillar oder durch direkte Synthese auf den Array unter Verwendung von photolithographischen Masken oder von digitalen Mikrosiegeln. Anstelle von Glasträgern können
- 20 auch Membranen und Filter, Polystyren-Matrices, Nanowell-Platten sowie Micropartikel Verwendung finden (29).

- Der ProteinArray wird mit einer geeigneten Verdünnung von Patientenseren oder auch von Patienten-Gelenkergüssen inkubiert. Während dieser Inkubation können etwaig vorhandene Antikörper mit Spezifität für eine oder mehrere Protein-Komponenten an diese Protein-Antigene binden.
- 25 Anschließend erfolgt ein Waschschriff, um ungebundene Antikörper und Serum-Komponenten zu entfernen. Anschließend erfolgt Inkubation mit einem Zweitantikörper, der zum einen geeignet ist, eine erfolgte Antigen-Antikörper-Reaktion über Bindung des Erstantikörpers zu markieren und zum anderen eine geeignete Markierung, die eine Visualisierung und Quantifizierung erlaubt, geeigneterweise einen kovalent gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff oder einem kovalent gekoppeltem
- 30 Enzym, das aus einem Vorläufer einen Farbstoff bilden kann. Anschließend erfolgt ein weiterer Waschschriff, um überschüssigen Zweitantikörper zu entfernen.

#### *SuspensionsArray (30)*

- Der SuspensionsArray verwendet als Matrix Plastik-Partikel, die mit den genannten Proteinen beschichtet werden. Dabei unterscheiden sich die optischen Eigenschaften der Partikel, die mit einem
- 35 bestimmten Protein gekoppelt sind, von denen, die mit einem anderen Protein gekoppelt sind. Die immunomische Bestimmung erfolgt analog durch Inkubation mit Patientenseren oder anderen



Körperflüssigkeiten. Über die Antikörperbindung wird direkt oder wieder indirekt durch einen geeigneten Zweitantikörper ein weiteres optisches (fluoreszierendes) Signal gesetzt. Die Analyse erfolgt dann in einem Vielfarben-Fluorescence Aktivated Cell (FAC-) Scan.

#### *Zeitaufgelöste ProteinArrays (31)*

- 5 Eine Polystyren-Oberfläche wird mit verschiedenen Proteinen oder Protein-Teilsequenzen aus Tabellen 1 und 2 gekoppelt. Die zu analysierenden Antikörper der Patientenserum werden biotinyliert unter Verwendung eines aktiven Biotin-Esters. Alternativ können zur Vermeidung von Inter-Patienten-Schwankungen durch unterschiedliche Biotinylierungseffizienz auch biotinylierte Sekundärantikörper verwendet werden, die spezifisch für humane Antikörper sind. Patienten-
- 10 Antikörper werden dann mit den Protein-gekoppelten Polystyren-Oberflächen inkubiert. Nach anschließendem Waschschrift erfolgt Detektion mittels Streptavidin, das mit einem fluoreszierenden Europium-Chelat gekoppelt ist. Der Nachweis erfolgt nach einem Wasch- und Trocknungsschritt mittels laserangeregter, zeitaufgelöster Festphasenfluoreszenzanalyse.

#### *Daten-Muster und multifaktorielle Analyse*

- 15 Parameter (z.B. die Autoreaktivitäten, die sich aus den in Tabelle 1 und 2 gelisteten Proteinen / Autoantigenen ergeben; z.B. die Autoreaktivitäten RF/ citrullin/ BIP/ Calpastatin/ Calreticulin/ RA33) werden so vollständig wie möglich bestimmt. Daten-Muster einzelner Patienten mit mehr als zwei aus sechs Missing Values werden a-priori von der Analyse ausgeschlossen.

- 20 Die Auswertung des Immundetektionssystems liefert für jeden Patienten und jede Autoreaktivität entweder ein negatives oder ein positives Ergebnis. Alternativ sind auch kontinuierliche Werte (ProteinArray, ELISA) möglich, die entweder artefiziell (mathematisch) oder über einen kontrollgruppenbezogenen (Analyse gegen geeignete Kontrollgruppe, z.B. age- und sex-matched gesunde Kontrollen oder Kontroll-Patienten mit einer anderen Erkrankung) Cut Off in positiv und negativ unterteilt werden. Jedes Daten-Muster wird mit dem CLASSIF1 Programm-System(32)
- 25 analysiert und klassifiziert.

In einem ersten Schritt werden Tripel-Matrix-Charaktere einer jeden klinischen Diagnose-Kategorie in die erste Referenz-Klassifizierungsmaske eingegeben. Jeder Patient wird dann gemäß der höchsten Positionsübereinstimmung zwischen der Patienten-Maske und einer klinischen Referenz-Maske klassifiziert.

- 30 In einem zweiten Schritt werden diejenigen Daten-Spalten eliminiert, die den Tripel-Matrix-Charakter "0" für alle Referenz-Masken aufweisen, da diese nicht in der Lage sind, zwischen den Krankheits-Entitäten zu diskriminieren.

- In einem dritten Schritt eliminiert der CLASSIF1-Algorithmus vorübergehend entweder einzelne Parameter oder Kombinationen von zwei Parametern in allen Permutationen aus dem
- 35 Klassifikationsprozess. Das gesamte Datenset wird dann reklassifiziert. Parameter, die durch ihr

vorübergehendes Entfernen das Klassifikationsergebnis beeinträchtigen, sind informativ, da offenbar keine essentielle Information verloren geht. Der Informationsgehalt eines jeden Parameters wird zwischenzeitlich durch den Algorithmus bereitgehalten, nach der Operation wieder eingesetzt und der nächste Parameter bzw. das nächste Parameterpaar zeitweise extrahiert und analog analysiert. Das zeitweise Entfernen und Wiedereinsetzen wird so lange durchgeführt, bis der Informationsgehalt aller Parameter, entweder einzeln oder in Kombination, bekannt ist. Parameter, die sich als unformativ entweder einzeln oder in Kombination mit einem weiteren Parameter erwiesen haben, werden eliminiert. Die verbleibende Sequenz informativer Parameter bildet die Referenz-Klassifikations-Maske für die jeweilige klinische Prediktionskategorie.

- 10 In einem vierten Schritt wird die Klassifizierung optimiert durch Klassifizierung der Percentil-Schwellenwerte 10/90%, 15/85%, 20/80%, 25/75% und 30/70% mit anschließender Auswahl des am besten diskriminierenden Paares. Die besten Klassifikationsergebnisse werden typischerweise zwischen den 10/90% und 25/75% Perzentilenpaaren erzielt. Negative und positive prediktive Werte in einer Confusion Matrix liefern Informationen darüber, wie gut Referenz- und zu testende Proben durch das oder die verwendeten Muster diskriminiert werden.

- 15 Zusätzlich werden die Daten-Muster eines jeden Patienten einer multifaktoriellen Analyse unterzogen. Die Multifaktoren für fünf Parameter-Muster wurden durch Multiplikation oder Division der verschiedenen Parameter in allen möglichen Kombinationen erhalten, gefolgt von Standardisierung der fünf Daten-Spalten gegenüber den Mittelwerten der RA-Referenz-Gruppe. Anschließend wurden 20 die Mittelwerte für jeden Parameter der übrigen Patienten-Gruppen (z.B. OA, reA, PsoA, andere) ermittelt. Multifaktoren aller Parameter-Permutationen wurden entweder durch Multiplikation ermittelt, wenn der Parameter-Mittelwert der betreffenden Patientengruppe gegenüber dem Referenzwert (RA) erhöht war, oder durch Division, wenn der Wert erniedrigt war.

- 25 Die multifaktorielle Datenbank beinhaltet die gemessenen Parameter (RF/ Citrullin/ BiP/ Calpastatin/ Calreticulin/ RA33). 26 Multifaktoren wurden durch den CLASSIF1-Algorithmus klassifiziert. Hierfür wurden alle Zahlen einer jeden Datenbank-Spalte entweder in - (kleiner als die untere Perzentile der Werteverteilung der Referenzpatienten [RA]), 0 (zwischen unterer und oberer Perzentile) oder + (größer als die obere Perzentile) Tripel-Matrix-Charaktere transformiert. Im Anschluss an die Transformation der Datenbank-Spalten wird eine Confusion Matrix zwischen klinischer Diagnose und 30 Computer-Klassifikation etabliert.

- Die Diagonalwerte dieser Confusion Matrix repräsentieren die Spezifität der Referenzproben und die Sensitivität für die zu testenden Proben. Diese werden während des anschließenden iterativen Lernprozesses weiter optimiert. Eine optimale Klassifizierung ist erreicht, wenn alle Proben korrekt klassifiziert sind, wenn also alle Diagonalwerte der Confusion Matrix 100% erreichen und die Werte 35 der nicht diagonalen Felder 0% sind. Der Lernprozeß dient der Eliminierung nicht-informativer Parameter und somit einer Anreicherung der diskriminierenden Parameter.

## Legende zur Figur

### Figur 1: Autoreaktivitätsmuster mit RA33, RF, Citrullin, BiP und Calpastatin

- 5 Dargestellt sind alle 32 möglichen Kombinationen der Autoreaktivitäten gegen IgG (RF), Citrullin, BiP, Calpastatin, RA33 und Calpastatin für die Krankheitsentitäten RA (rheumatoide Arthritis), reA (reaktive Arthritis), OA (Osteoarthrose), PsoA (Psoriasis-assoziierte Arthritis) und andere.

10

## Abkürzungsverzeichnis

	ACR	American College of Rheumatologie
	BiP	Binding Protein, Heavy Chain Binding Protein
15	BSA	Rinder-Serum-Albumin (Bovine serum albumin)
	Calp	Calpastatin
	Calr	Calreticulin
	Calp	Calpastatin
	cDNA	complementary DNA, copy DNA
20	CH	Chondrocyte Antigen
	Cit	citrullinierte Peptide
	CrP	C-reaktives Protein
	DNA	Desoxyribonucleinsäure (desoxyribonucleic acid)
	DPNII	von Diplococcus pneumoniae
25	dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate (equimolare Mischung aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
	dNTP	Deoxynucleotidtriphosphat
	EBNA-1	Epstein Barr Virus Nuclear Antigen-1
	EBV	Epstein-Barr-Virus
30	ER	endoplasmatisches Reticulum
	FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
	GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
	HC	Human Cartilage

	HC gp39	Human Cartilage Glycoprotein 39
	HLA-System	Histokompatibilitäts-Antigene (HLA – human leucocyte antigen)
	HLA-DR4	HLA-Merkmal, das eine erhöhte Assoziation mit einer rheumatoiden Arthritis aufweist
5	hnRNP	heterogenous ribonucleoprotein (RA33 )
	Hsp	Heatshock Protein
	Ig	Immunglobulin
	IgG	Immunglobulin G
	IL-	Interleukin
10	IR-3	Internal Repeat Region 3
	MCTD	Mixed Connective Tissue Disease (Mischkollagenose)
	MHC-	Major Histocompatibilitäts Komplex
	MMP	Matrix Metalloproteinase
	mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
15	NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
	NCBI	National Center for Biotechnology Information
	ND	Normal Donor (Normalspender)
	OA	Osteoarthrose
	O-GlcNAc	O-N-Acetylglucosamin
20	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
	PHA	Phytohemagglutinin
	PM/DM	Polymyositis / Dermatomyositis
	PsoA	Psoriasis-assoziierte Arthritis
	RA	Rheumatoide Arthritis
25	RA-A47	Arthritis-related antigen
	RA33	hnRNP A2
	RDA	Representational Difference Analysis
	reA	reaktive Arthritis
	RF	Rheumafaktoren
30	RNA	Ribonucleinsäure
	RPMI	handelsübliches Zellkulturmedium, Verdünnungsmedium RPMI 1640; Moore, G. E. et al., J. Am. Assoc. 199, 519 - 524, 1967)
	RsaI	DNA-Restriktionsenzym RsaI von Rhodopseudomonas sphaeroides
	RT	Reverse Transcriptase (RT)

Sa-Antigen	50k-Protein aus humaner Milz und Placenta
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SSH	Suppression Subtractive Hybridization
TGF	transforming growth factor
5 UNIGENE	UniGene ist ein experimentelles System zur automatischen Partitionierung der GenBank Sequenzen in ein nicht-redundantes Set an genorientierten Clustern.
YKL-39	human cartilage-related protein

10

## Referenzen

15

20

25

30

35

40

45

1. Arnett, F. C., S. M. Edworthy, D. A. Bloch, D. J. McShane, J. F. Fries, N. S. Cooper, L. A. Healey, S. R. Kaplan, M. H. Liang, H. S. Luthra, and et al. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31:315.
2. Kaps, C., C. Bramlage, H. Smolian, A. Haisch, U. Ungethum, G. R. Burmester, M. Sittlinger, G. Gross, and T. Haupl. 2002. Bone morphogenetic proteins promote cartilage differentiation and protect engineered artificial cartilage from fibroblast invasion and destruction. *Arthritis Rheum* 46:149.
3. Roudier, J., G. Rhodes, J. Petersen, J. H. Vaughan, and D. A. Carson. 1988. The Epstein-Barr virus glycoprotein gp110, a molecular link between HLA DR4, HLA DR1, and rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 27:367.
4. Albani, S., E. C. Keystone, J. L. Nelson, W. E. Ollier, A. La Cava, A. C. Montemayor, D. A. Weber, C. Montecucco, A. Martini, and D. A. Carson. 1995. Positive selection in autoimmunity: abnormal immune responses to a bacterial dnaJ antigenic determinant in patients with early rheumatoid arthritis. *Nat Med* 1:448.
5. Despres, N., G. Boire, F. J. Lopez-Longo, and H. A. Menard. 1994. The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 21:1027.
6. Schellekens, G. A., B. A. de Jong, F. H. van den Hoogen, L. B. van de Putte, and W. J. van Venrooij. 1998. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 101:273.
7. Girbal-Neuhausser, E., J. J. Durieux, M. Arnaud, P. Dalbon, M. Sebbag, C. Vincent, M. Simon, T. Senshu, C. Masson-Bessiere, C. Jolivet-Reynaud, M. Jolivet, and G. Serre. 1999. The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. *J Immunol* 162:585.
8. Alsalameh, S., J. Mollenhauer, N. Hain, K. P. Stock, J. R. Kalden, and G. R. Burmester. 1990. Cellular immune response toward human articular chondrocytes. T cell reactivities against chondrocyte and fibroblast membranes in destructive joint diseases. *Arthritis Rheum* 33:1477.
9. DeRisi, J., L. Penland, P. O. Brown, M. L. Bittner, P. S. Meltzer, M. Ray, Y. Chen, Y. A. Su, and J. M. Trent. 1996. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 14:457.
10. Haab, B. B., M. J. Dunham, and P. O. Brown. 2001. Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol* 2:RESEARCH0004.
11. Robinson, W. H., C. DiGennaro, W. Hueber, B. B. Haab, M. Kamachi, E. J. Dean, S. Fournel, D. Fong, M. C. Genovese, H. E. de Vegvar, K. Skriver, D. L. Hirschberg, R. I. Morris, S.

Muller, G. J. Pruijn, W. J. van Venrooij, J. S. Smolen, P. O. Brown, L. Steinman, and P. J. Utz. 2002. Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nat Med* 8:295.

12. Eberwine, J. 1996. Amplification of mRNA populations using aRNA generated from immobilized oligo(dT)-T7 primed cDNA. *Biotechniques* 20:584.
13. Cook, A. F., E. Vuocolo, and C. L. Brakel. 1988. Synthesis and hybridization of a series of biotinylated oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 16:4077.
14. Okamoto, T., T. Suzuki, and N. Yamamoto. 2000. Microarray fabrication with covalent attachment of DNA using bubble jet technology. *Nat Biotechnol* 18:438.
15. Fodor, S. P., J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, and D. Solas. 1991. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251:767.
16. Barone, A. D., J. E. Beecher, P. A. Bury, C. Chen, T. Doede, J. A. Fidanza, and G. H. McGall. 2001. Photolithographic synthesis of high-density oligonucleotide probe arrays. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 20:525.
17. Hubank, M., and D. G. Schatz. 1994. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* 22:5640.
18. Lisitsyn, N., and M. Wigler. 1993. Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 259:946.
19. Bussow, K., E. Nordhoff, C. Lubbert, H. Lehrach, and G. Walter. 2000. A human cDNA library for high-throughput protein expression screening. *Genomics* 65:1.
20. Altman, R., G. Alarcon, D. Appelrouth, D. Bloch, D. Borenstein, K. Brandt, C. Brown, T. D. Cooke, W. Daniel, D. Feldman, and et al. 1991. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum* 34:505.
21. Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156.
22. Diatchenko, L., Y. F. Lau, A. P. Campbell, A. Chenchik, F. Moqadam, B. Huang, S. Lukyanov, K. Lukyanov, N. Gurskaya, E. D. Sverdlov, and P. D. Siebert. 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6025.
23. Gress, T. M., J. D. Hoheisel, G. G. Lennon, G. Zehetner, and H. Lehrach. 1992. Hybridization fingerprinting of high-density cDNA-library arrays with cDNA pools derived from whole tissues. *Mamm Genome* 3:609.
24. Lennon, G. G., and H. Lehrach. 1991. Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries. *Trends Genet* 7:314.
25. Krenn, V., A. Konig, F. Hensel, C. Berek, M. M. Souto Carneiro, W. Haedicke, Y. Wang, H. Vollmers, and H. K. Muller-Hermelink. 1999. Molecular analysis of rheumatoid factor (RF)-negative B cell hybridomas from rheumatoid synovial tissue: evidence for an antigen-induced stimulation with selection of high mutated IgVH and low mutated IgVL/lambda genes. *Clin Exp Immunol* 115:168.
26. Leushner, J. 2001. MALDI TOF mass spectrometry: an emerging platform for genomics and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 1:11.
27. MacBeath, G., and S. L. Schreiber. 2000. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* 289:1760.
28. Walter, G., K. Bussow, D. Cahill, A. Lueking, and H. Lehrach. 2000. Protein arrays for gene expression and molecular interaction screening. *Curr Opin Microbiol* 3:298.
29. Spiro, A., M. Lowe, and D. Brown. 2000. A bead-based method for multiplexed identification and quantitation of DNA sequences using flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* 66:4258.
30. Nolan, J. P., and F. F. Mandy. 2001. Suspension array technology: new tools for gene and protein analysis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 47:1241.
31. Madersbacher, S., and P. Berger. 2000. Antibodies and immunoassays. *Methods* 21:41.
32. Valet, G., M. Valet, D. Tschöpe, H. Gabriel, G. Rothe, W. Kellermann, and H. Kahle. 1993. White cell and thrombocyte disorders. Standardized, self-learning flow cytometric list mode data classification with the CLASSIF1 program system. *Ann N Y Acad Sci* 677:233.

## Patentansprüche

1. Werkzeuge zur Diagnostik, molekularen Definition und Therapieentwicklung chronischer entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser Erkrankungen beim Menschen unter Verwendung der Sequenzen einzelner Gene, einer Auswahl von Genen oder aller Gene, die in der Tabelle 1 genannt sind, sowie der Gene, die für die Proteine, die in der Tabelle 2 genannt sind, codieren.
2. Werkzeuge nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie Gensequenzen einbeziehen, die in ihrer Sequenz identisch zu den in der Tabelle 1 genannten Genen bzw. zu den Genen, die für die in der Tabelle 2 genannten Proteine codieren, sind oder mindestens 80% Sequenzidentität in den Protein-kodierenden Abschnitten besitzen.
3. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass sie Sequenzabschnitte oder Teilsequenzen einbeziehen, die in ihrer Sequenz identisch sind zu den in der Tabelle 1 genannten und unter Anspruch 2 fallenden Gene oder eine Sequenzidentität von mindestens 80% zu den entsprechenden Abschnitten der genannten Gene besitzen.
4. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung eines
  - 4.1. High-Throughput Verfahrens der (Micro-) Array-Hybridisierung
  - 4.2. High-Throughput Verfahrens mit Techniken der Polymerase-Ketten-Reaktion zur (Semi-) Quantifizierungberuhen.
5. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung einer markierten Patientenprobe und einer zweiten unterschiedlich markierten Kontrollprobe zur vergleichenden Doppel-Hybridisierung an einen (Micro-) Array zusammen mit der Patientenprobe (rot/grün Vergleichs-Hybridisierung) beruhen.
6. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 für diagnostische Zwecke, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung einzelner, einer Auswahl oder aller aus den Gensequenzen in Anspruch 1 bis 3 abgeleiteten Proteine bzw. Peptide beruhen.
7. Werkzeuge nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung einzelner Proteine, einer Auswahl von Proteinen oder aller Proteine, die in der Tabelle 2 genannt sind, beruhen.

8. Werkzeuge nach den Ansprüchen 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung von Teilsequenzen einzelner Proteine, einer Auswahl von Proteinen oder aller Proteine, die in der Tabelle 1 genannt sind, beruhen.

9. Werkzeuge nach den Ansprüchen 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass sie Proteine oder Protein-Teilsequenzen einbeziehen, die in ihrer Sequenz identisch zu den in der Tabelle 1 abgeleiteten Proteinen oder den in der Tabelle 2 genannten Proteinen sind oder mindestens 80% Sequenzidentität besitzen.

10. Werkzeuge nach den Ansprüchen 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung von

10.1. High-Throughput Verfahren in der Protein-Expressionsanalytik (hochauflösende, zweidimensionale Protein-Gelelektrophorese, MALDI-Techniken)

10.2. High-Throughput Verfahren in der Protein-Spotting Technik (Protein Arrays) zum Screening von Autoantikörpern als diagnostisches Werkzeug für entzündliche Gelenkerkrankungen und andere entzündliche, infektiöse oder tumoröse Erkrankungen beim Menschen

10.3. High-Throughput Verfahren in der Protein-Spotting Technik (Protein Arrays) zum Screening von autoreaktiven T-Zellen als diagnostisches Werkzeug für entzündliche Gelenkerkrankungen und andere entzündliche, infektiöse oder tumoröse Erkrankungen beim Menschen

10.4. Nicht-High-Throughput Verfahren in der Protein-Spotting Technik zum Screening von autoreaktiven T-Zellen als diagnostisches Werkzeug für entzündliche Gelenkerkrankungen und andere entzündliche, infektiöse oder tumoröse Erkrankungen beim Menschen  
beruhen.

11. Werkzeuge nach den Ansprüchen 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung von Antikörpern, die spezifisch für Proteine oder Teilsequenzen sind, die unter den Ansprüchen 6 bis 9 aufgeführt sind, beruhen.

12. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung der entsprechenden homologen Sequenzen einer anderen Spezies zur Analytik in Tierexperimenten oder zur Diagnostik bei Tieren mit entzündlichen Gelenkerkrankungen und anderen entzündlichen, infektiösen oder tumorösen Erkrankungen beruhen.

13. Werkzeuge nach den Ansprüchen 6 bis 11 als diagnostische Werkzeuge zum Nachweis genetischer Veränderungen (Mutationen) in den unter Anspruch 1 bis 3 genannten Genen oder deren



Regulationssequenzen (Promotor, Enhancer, Silencer, spezifische Sequenzen für die Bindung weiterer regulatorischer Faktoren).

- 5 14. Werkzeuge nach den Ansprüchen 6 bis 11 und 13 zum Nachweis genetischer Veränderungen (Mutationen) in den Genen oder deren Regulationssequenzen (Promotor, Enhancer, Silencer, spezifische Sequenzen für die Bindung weiterer regulatorischer Faktoren), die für die in der Tabelle 2 genannten Proteine codieren.
- 10 15. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 zur molekularen Definition entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser Erkrankungen beim Menschen unter Verwendung der in Anspruch 1-3 benannten Gene, DNA-Sequenzen oder davon abgeleitete Proteine oder Peptide sowie der Proteine und Protein-Teilsequenzen aus Anspruch 6 bis 9 oder den dafür codierenden Gensequenzen.
- 15 16. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 zum Therapie-Entscheid entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser Erkrankungen beim Menschen unter Verwendung der in Anspruch 1-3 benannten Gene, DNA-Sequenzen oder davon abgeleitete Proteine oder Peptide.
- 20 17. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 zur Verlaufskontrolle/Therapiekontrolle entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser Erkrankungen beim Menschen unter Verwendung der in Anspruch 1-3 benannten Gene, DNA-Sequenzen oder davon abgeleitete Proteine oder Peptide.
- 25 18. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 als molekulare Werkzeuge zur Entwicklung von Therapiekonzepten, die die direkte oder indirekte Beeinflussung der Expression der in Anspruch 1-3 benannten Gene oder Gensequenzen beinhalten.
- 30 19. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 und 18 zur Entwicklung von Therapiekonzepten, die die direkte oder indirekte Beeinflussung der Expression der in Anspruch 6 bis 9 benannten Proteine oder Protein-Teilsequenzen beinhalten.
- 35 20. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 und 18 bis 19 zur Entwicklung von Therapiekonzepten, die die direkte oder indirekte Beeinflussung der autoreaktiver T-Zellen, gerichtet gegen die in Anspruch 8-11 benannten Proteine oder Protein-Teilsequenzen, beinhalten.

21. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 und 18 bis 20 zur Beeinflussung der biologischen Wirkung der aus den in Anspruch 1-3 benannten Gensequenzen abgeleiteten Proteine.

22. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 und 18 bis 21 zur Beeinflussung der unmittelbaren molekularen Regelkreise, in die die in Anspruch 1-3 benannten Gene und davon abgeleiteten Proteine eingebunden sind.

23. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 und 18 bis 22 zur Entwicklung von Therapiekonzepten unter Design und Verwendung von Interpretationsalgorithmen, die die genannten Gene und Sequenzen und deren Regulationsmechanismen verwenden, um Therapiekonzepte, -wirkungen, -optimierungen oder Krankheitsprognosen erkennen zu lassen oder vorausszusagen.

24. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 und 18 bis 22 zur Entwicklung von biologisch wirksamen Medikamenten (Biologicals) unter Verwendung von Genen, Gensequenzen, Regulation von Genen oder Gensequenzen, oder unter Verwendung von Proteinen, Proteinsequenzen, Fusionsproteinen nach Ansprüchen 1 bis 3 und 6 bis 9 oder unter Verwendung von Antikörpern oder autoreaktiven T-Zellen nach den Ansprüchen 10-14.

25. Array als molekulares Werkzeug, bestehend aus verschiedenen Antikörpern oder Molekülen mit vergleichbarem proteinspezifischen Bindungsverhalten, die zum Nachweis aller oder einer Auswahl der von den Genen der Tabelle 1 abgeleiteten Proteine oder aller bzw. einer Auswahl der Proteine der Tabelle 2 dienen.

26. Verwendung von Werkzeugen nach den Ansprüchen 1 bis 24 zur

26.1. Untersuchung von Blutproben oder Gewebeproben in der medizinischen Diagnostik

26.2. Anwendung in der Analytik nach Beispiel 1

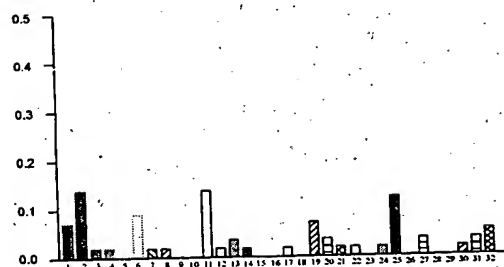
26.3. Anwendung für für Therapiekonzepte nach Beispiel 2.

### Zusammenfassung

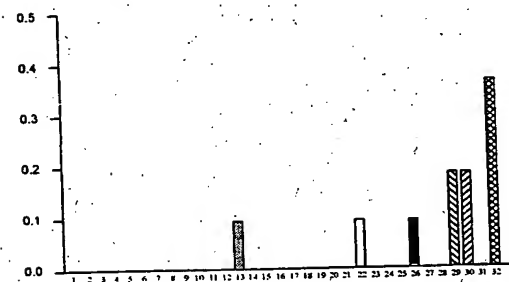
Die Erfindung betrifft Werkzeuge zur Diagnostik, molekularen Definition und Therapie-Entwicklung chronischer entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser Erkrankungen auf der Grundlage von Genomdaten (Genomics), Proteomdaten (Proteomics) und Immunomdaten (Immunomics) in der Analyse und Therapie-Entwicklung bei chronischen Gelenkerkrankungen. Die Erfindung beruht auf der Verwendung von Gensequenzen sowie abgeleiteten mRNAs und Proteinen sowie auf Antikörpern mit Spezifität für die abgeleiteten Proteine zur Charakterisierung von entzündlich-rheumatischen und nicht-entzündlichen rheumatischen Gelenkerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Infektionserkrankungen. Aus den Untersuchungen können ätiologisch bedeutsame Pathogenitätsprinzipien der bislang ungeklärten chronisch-entzündlichen Gelenkerkrankungen abgeleitet werden. Ferner können Interpretationsalgorithmen zur Klassifikation, Prognosebeurteilung und Therapieoptimierung dieser Gelenkerkrankungen aufgebaut und neue Therapiestrategien und Angriffspunkte für Medikamente abgeleitet werden.

Figur 1

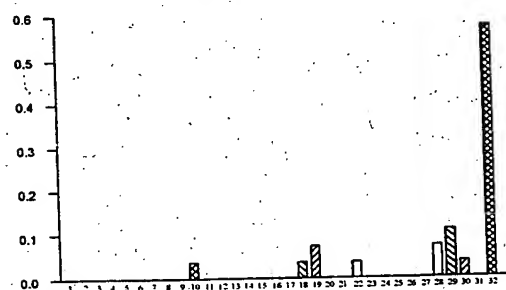
1/1



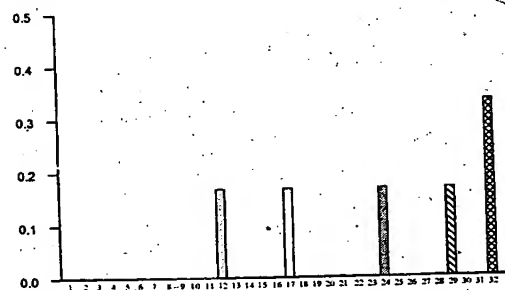
RA



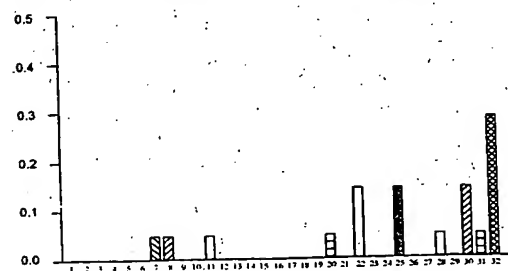
reA



OA



PsoA



Andere